

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

**POSIBLES MECANISMOS DE
NEUROPROTECCIÓN EN LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Carolina Ruiz Romero
Madrid, 2012

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

POSIBLES MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Memoria de la Tesis para optar al grado de Doctor presentada por
la licenciada en Ciencias Bioquímicas:
Carolina Ruiz Romero

Directores de Tesis:

Dr. Justo García de Yébenes
Servicio de Neurología
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Dra. M^a Angeles Mena Gómez
Servicio de Neurobiología-Investigación
Hospital Universitario Ramón y Cajal

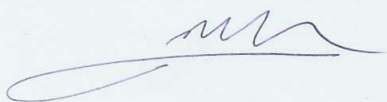
HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL
Servicio de Neurología y Neurobiología
Departamento de Investigación

Carretera de Colmenar Km.9100
28034 Madrid, Spain
TLF: 91.336.8399-8384
FAX: 91.336.8399

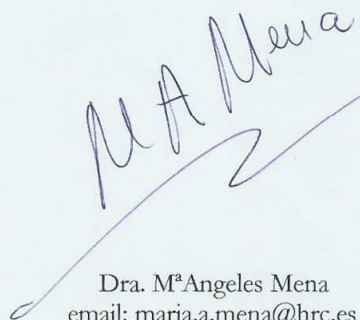
Los Drs. Justo García de Yébenes y M^aAngeles Mena, facultativos de los servicios de Neurología y Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, como directores del trabajo de investigación de la tesis doctoral: "Posibles mecanismos de neuroprotección en la enfermedad de Huntington", realizada en el servicio de Neurología y Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

CERTIFICAN:

Que este estudio experimental llevado a cabo por Dña. Carolina Ruiz Romero, es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Molecular de la facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid



Dr. Justo Gcía de Yébenes
Email: jgyebenes@yahoo.com



Dra. M^aAngeles Mena
email: maria.a.mena@hrc.es

Este trabajo ha sido realizado en el Servicio de Neurología y Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, gracias a los proyectos FIS 2007/275, FIS 2010/172, CIBERNED 2006/05/0059, CIBERNED PI2010-6, CAM 2011/BMD-2308 y MINCIN 2011.

Agradecimientos

Pensé que esta parte de la tesis era la más fácil de escribir, pero me he dado cuenta de que quizá es la más complicada debido a la cantidad de gente que me gustaría darle las gracias de una manera u otra, así que intentaré no ser demasiado pesada..

En primer lugar quiero dar las gracias a mis padres. Los pongo en primer lugar a cosa hecha, ellos son lo más importante para mí y los que más me han apoyado en todos estos años de trabajo y esfuerzo que parece que por fin han dado su fruto, esta tesis doctoral. Mamá, papá: sabéis lo mucho que os quiero y lo mucho que os necesito a mi lado. Gracias por TODO, sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Me habéis sabido aconsejar, darme ánimos, apoyo y tranquilidad en momentos difíciles, no dejar que tirara la toalla y guiarme siempre hacia caminos correctos. Os admiro y os adoro. Sois los mejores padres que nadie pueda tener. Gracias y mil gracias.

A continuación quiero dar las gracias a mis directores de tesis. A Justo García de Yébenes por haberme permitido trabajar estos años en este proyecto del cual espero que salga algo muy novedoso y a M^a Angeles Mena, muchas gracias por todo el esfuerzo que has dedicado en co-dirigir esta tesis. Y bueno, a mis compis de labo por supuesto agradecerles su inestimable ayuda y su compañerismo incondicional. Ana, Juan, Jose, Laura, Meryjoe, Rosa, Isabel, Lauris, Marian, Moni, Eva, M^a Paz.; cada uno de vosotros sabéis todo lo que me habeis ayudado y cuánto os lo agradezco, me llevo muy buen recuerdo de vosotros. Ana y Juanito ya sois como Pin y Pon...gracias por ayudarme siempre. Meryjoe, nunca olvidaré ese momento en el quirófano de animales, mascarillas puestas, tus ojos de sorpresa...tu padre es Jose M^a y tu madre Julia?...te acuerdas? Mi babysitter preferida! Rafita, gracias por ser una persona tan buena y ayudarme en todo lo que te he pedido, nunca cambies. A mi Silvi, sabes que te quiero mucho y que tú también has sido muy importante en todo este viaje! Sin embargo, no me puedo olvidar de mis dos grandes “amores” en este laboratorio, Izaskun y Paty. Qué puedo deciros que no os haya dicho ya. Os quiero y me alegro de haberos conocido y haber sacado de estos años una amistad tan bonita como la nuestra. Hemos pasado muy buenos momentos juntas, pero también hemos llorado y pasado malos ratos que al final, apoyándonos, hemos sabido cómo solucionar y hacerlo todo mucho mas fácil. Gracias por estar a mi lado siempre y tenéis una amiga para siempre.

Pero mi camino doctoral no empezó directamente en este laboratorio...aquí la “menda” dio algunas vueltas por otros lares científicos, lo cual me proporcionó mucha experiencia laboral y el conocer a gente maravillosa. En primer lugar acordarme de mi

Gemita, de cuando empecé en 2005 mi andanza en este hospital y estaba muy perdida, con ella he pasado muy buenos momentos y ella sabe que le tengo un cariño muy especial. A todo el pasillo de bioquímica le agradezco el apoyo que me disteis en aquellos meses también. Después fui hacia hematología, con el gran Dr. Luis Escribano, para trabajar en mastocitosis, y donde conocí a Lucía, Isabel, Fernando, y a la fallecida Rosa a la cual quería y estimaba. A todos ellos también gracias por haberme enseñado tanto. En el año 2007 comencé de nuevo mi aventura predoctoral en el CNB, en cristalografía de rayos X, donde compartí poyata con gente excepcional como Román, Angela, César y Juan. Sabéis que tengo recuerdos maravillosos con vosotros y que lo pasé fenomenal ese año, lástima que, como siempre, se acabara la financiación y tuviera que marchar.

Qué puedo decir de mis maris...solo nombraros me provoca un nudo en el estómago.... con las que comencé la facultad y a las cuales conozco desde hace ya 12 años, no tengo más que palabras de agradecimiento y amor para vosotras. Amaya, Lucy, Lidia, Nagore, qué os voy a decir que no sepáis ya. Que sin vosotras no puedo estar, que os necesito a mi lado y que vuestra amistad es tan importante para mí como respirar, os quiero, os adoro, por Norma!! A este grupo se unió mi Meri, la cual se ha convertido en otro pedacito de mí en estos años y con la que hablo diariamente y necesito diariamente. Gracias Meri por estar. Y a mis niños! Que también los quiero muchísimo por todos esos grandes momentos que hemos compartido y espero que sigamos haciéndolo durante muchos años más! Luisja, Cuesta, Coloma, Deivid, Francis...mis “maros” que os quiero yo madre! A Gon, Dani, Noe...muchos buenos momentos juntos que sé que volveremos a vivir pronto! Os quiero mucho. También me acuerdo de Javi, que fue muy importante para mí durante 4 años y al cual agradezco también un pedacito de esta tesis. Y al pequeño Mario, vaya tardes más buenas hemos pasado haciéndole el baulito a nuestro “sobri” preferido...

Agradecer también su compañía y amistad a mis 2 churris preferidas: Esther y Marta. Tantas vivencias juntas y tanto aguantarme con la tesis auestas! Sabéis que os necesito ya a mi lado, que me habéis dado momentos y viajes inolvidables y espero que haya muchísimos más! Nenas, no os separéis nunca de mí! Y siempre nos quedará Sagres! Richar hemos pasado tantos buenos momentos!! Me quedo con eso. Y Saulito y Ali... os quiero mucho a vosotros también! Larri, que no me olvido de ti, gracias por dejarme ser tan pesada contigo y por ayudarme siempre!

También mencionar a mis chicas del instituto, Carol, Lara, Odette, Lele, Palomilla y Zaira. Aunque no nos veamos mucho, sabéis que os tengo mucho cariño y esto también va dedicado a vosotras!

No puedo olvidarme del resto de mi familia, mis tíos, mis primos, Mercedes, mis primas, mis sobrinitas! Por fin me voy a doctorar y espero que podáis venir a verme. Y a mi abuelita Mariana, la única que me queda, que con 92 años está estupenda aunque le falle un poco la cabeza.... Abuela, se me saltan las lágrimas si hablo más tiempo de ti, te quiero con toda mi alma y esta tesis también va dedicada a ti.

Y, por supuesto y para finalizar, no me puedo olvidar de la escalada, gracias a la cual he podido desconectar del trabajo, olvidarme de mis movidas, y sobre todo porque me ha permitido conocer a gente maravillosa con la que espero seguir compartiendo tardes y salidas a la roca durante mucho tiempo. Salamandreros y cia, todos y cada uno sabéis quiénes sois...os adoro!! Joaquinito que te quiero musho!!

Seguiría agradeciendo la tesis a mucha gente más, pero creo que los más importantes están aquí plasmados. Este camino no ha sido fácil y reconozco que la gente que tienes a tu lado y te quiere es la que te da fuerzas para seguir.

Gracias, gracias y mil gracias.

ÍNDICE

INDICE	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	4
1. DEFINICIÓN E HISTORIA	5
1.1. Datos clínicos	6
- Epidemiología	6
- Fenomenología clínica	6
- Neuropatología	7
2. PATOGÉNESIS	8
2.1. La proteína huntingtina	8
2.2. Posibles mecanismos patogénicos de la enfermedad de Huntington	9
3. MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	13
3.1. Modelos animales de la enfermedad de Huntington	13
3.1.1.. Modelos de lesión excitotóxica	13
3.1.2. Modelos de lesión por toxinas mitocondriales	14
3.1.3. Modelos de ratones transgénicos	14
• Ratones transgénicos con fragmentos de huntingtina	14
• Ratones transgénicos con la proteína huntingtina completa	15
3.1.4. Modelos de ratones knock-in	15
3.1.5. Modelos de ratones knock-out	16
3.1.6. Modelos de <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>Caenorabditis elegans</i>	16
3.2. Modelos celulares en la enfermedad de Huntington	16
4. TRATAMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	17
4.1. Tratamientos actuales en clínica	17
4.2. Erradicación o prevención en la enfermedad de Huntington	17

4.3. Neurorestauración	18
	19
5. NEUROPROTECCIÓN EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	20
5.1. Estrategias utilizadas	20
5.2. Dietas cetogénicas en la enfermedad de Huntington	21
5.3. Estabilizadores dopaminérgicos	22
5.4. Papel de la glía en la enfermedad de Huntington. El medio condicionado de glía como neuroprotector	23
III. OBJETIVOS	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
MATERIALES Y REACTIVOS	28
Anticuerpos	28
Reactivos para western blot	29
Reactivos para biología molecular	29
Reactivos para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica	30
Cultivos celulares	30
Reactivos para tratamientos de cultivos celulares	31
Otros reactivos	32
MÉTODOS	33
1. ANIMALES UTILIZADOS	33
1.1. Reproducción, desarrollo y comportamiento de los ratones transgénicos	33
1.2. Ratones mutantes para huntingtina R6/1	33
1.3. Ratones dobles transgénicos para huntingtina y parkina	33
2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO	35

2.1. Genotipado de ratones WT y PK ^{-/-}	35
2.2. Genotipado de ratones R6/1	35
3. ESTUDIOS DE CONDUCTA	36
3.1. Actividad motora	36
3.2. Laberinto en Y	36
3.3. Rotarod	37
3.4. Estudio de la zancada	37
4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	38
4.1. Obtención de muestras de tejido cerebral	38
4.2. Inmunohistoquímica	39
4.3. Ensayo de TUNEL	39
4.4. Determinación de monoaminas y sus metabolitos en estriado	40
4.5. Determinación de glutatión en tejido	40
4.6. Inmunodetección de proteínas a partir de tejido cerebral	40
5. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	41
5.1. Cultivos neuronales y células de glía	41
5.2. Tratamientos de las células STHdH ^{Q7/Q7} y STHdH ^{Q111/Q111}	42
5.3. Inmunocitoquímica	43
5.4. Valoración y cuantificación del área total ocupada por neuronas (β -tubulina) y determinación del número de células diferenciadas (sinaptofisina)	43
5.5. Ensayos de viabilidad y muerte celular en células STHdH ^{Q7/Q7} y STHdH ^{Q111/Q111}	44
5.5.1. Actividad mitocondrial	44
5.5.2. Condensación y fragmentación de cromatina	44
5.5.3. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	44
5.5.4. Ensayo de exclusión por azul de tripán e yoduro de propidio	45
5.6. Medidas de glutatión intracelular	45
5.7. Captación ³ H-GABA	45
5.8. Liberación y captación de alta afinidad para ³ H-dopamina	46
5.9. Electroforesis e inmunodetección de proteínas en cultivos celulares	46
5.10. Detección de proteínas ubiquitinizadas	47
5.11. Caracterización del perfil proteico del medio condicionado de glía fetal y medio definido	48

5.12. Cuantificación de radicales libres	48
6. ANALISIS ESTADÍSTICO	48
V. RESULTADOS	49
Estudios in vivo con ratones R6/1	50
1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES R6/1 A LO LARGO DEL TIEMPO	50
1.1. Estudio histológico a diferentes edades	50
2. ESTUDIO DE LA SUPRESIÓN PARCIAL DE PARKINA EN RATONES R6/1	52
2.1. Evolución y fenotipo de los animales	52
2.2. Ruta nigroestriatal de la dopamina y niveles estriatales de los metabolitos de las monoaminas	54
2.3. Inclusiones de huntingtina y muerte celular en las distintas áreas cerebrales	54
2.4. Mecanismos moleculares en la protección celular y muerte en ratones R6/1 y R6/1 /PK ^{+/-}	58
3. EFECTOS DE UNA DIETA RICA EN ACEITE DE OLIVA EN RATONES WT Y R6/1	60
3.1. Estudio en ratones R6/1 sintomáticos con dieta normal y suplementada con aceite de oliva durante 2 meses (5-7 meses de edad)	60
3.1.1. Peso corporal, comida y bebida ingerida	60
3.1.2. Estudio de comportamiento y fenotipo	60
3.1.3. Inclusiones de huntingtina y muerte celular en distintas áreas cerebrales	62
3.1.4. Mecanismos moleculares	63
3.2. Estudio en ratones WT y R6/1 con dieta normal y suplementada con aceite de oliva durante 5 meses (2-7 meses de edad)	64
3.2.1. Peso corporal, comida y bebida ingerida	65
3.2.2. Estudios de comportamiento y fenotipo	65
3.2.3. Inclusiones de huntingtina en distintas áreas cerebrales	66
3.2.4. Mecanismos moleculares	66

4. EFECTOS NEUROTÓXICOS EN UN MODELO CELULAR DE HUNTINGTON 68

4.1. Toxicidad inducida por glutamato sódico	68
4.2. Daño oxidativo inducido por agua oxigenada	69
4.3. Daño mitocondrial inducido por rotenona y ácido 3-nitropropiónico (3NP)	70

5. EFECTOS PROTECTORES Y REGENERADORES EN UN MODELO CELULAR DE HUNTINGTON 72

5.1. Estudio molecular del fármaco (-)- OSU6162 en células STHdH ^{Q7/Q7} y STHdH ^{Q111/Q111}	72
5.1.1. Efectos del (-)- OSU6162 sobre células Q7 y Q111	72
5.1.2. Efectos neuroprotectores del fármaco (-)- OSU6162 sobre la muerte celular inducida por glutamato sódico, H ₂ O ₂ , ácido 3NP y rotenona en células Q7 y Q111	73
5.1.3. Efectos del (-)- OSU6162 sobre los niveles de BDNF	78
5.1.4. Mecanismos moleculares de muerte y protección celular del estabilizador dopaminérgico (-)- OSU6162	80
5.1.5. Captación y liberación de ³ H-dopamina en células embrionarias de mesencéfalo de ratón	81
5.2. Efectos del medio condicionado de glia (MCG) sobre células Q111	82
5.2.1. Efectos del MCG estriatal fetal (E16) y glutamato sódico en células Q111 y Q7	82
5.2.2. Neuroprotección y regeneración celular del MCG fetal frente a daño oxidativo y mitocondrial	83
- Efectos del MCG fetal frente al daño mitocondrial producido por el 3NP en células Q111	83
- Efectos del MCG fetal frente al daño provocado por el H ₂ O ₂ en células Q111	84
5.2.3. Caracterización molecular de los efectos del MCG. Mecanismos moleculares de neuroprotección	87
5.2.4. Efectos del MCG estriatal postnatal de 13 días y 2 meses frente al daño oxidativo y mitocondrial en células Q111	89
5.3. Estudio comparativo entre factores de crecimiento y MCG fetal	91
5.3.1. Efectos del bFGF en células Q111 comparado con el MCG	91
5.3.2. Efectos del GDNF en células Q111 comparado con el MCG	93
5.3.3. Efectos del BDNF en células Q111 comparado con el MCG	95
5.3.4. Efectos de los factores de crecimiento y MCG fetal sobre la toxicidad inducida por H ₂ O ₂ en células Q111	95

VI. DISCUSIÓN	98
----------------------	----

VII. CONCLUSIONES	109
--------------------------	-----

VIII. BIBLIOGRAFÍA	112
---------------------------	-----

I. RESUMEN

I. RESUMEN

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, autosómica dominante, que se caracteriza por presentar síntomas motores, cognitivos y conductuales. Esta enfermedad se produce por la expansión anómala del triplete CAG, que codifica para glutamina, en la región N-terminal de la proteína huntingtina. La función fisiológica de esta proteína y su rol en la patogénesis de la enfermedad son desconocidos a día de hoy. La huntingtina mutada cambia su localización celular, provoca inclusiones citoplasmáticas y nucleares, cambia la transcripción de genes, altera la transmisión sináptica, produce disminución de la actividad mitocondrial, activa caspasas y otras moléculas pro-apoptóticas, provoca excitotoxicidad, altera la función del proteasoma, produce déficits metabólicos, reduce de la liberación y síntesis de factores neurotróficos y provoca daño oxidativo. Por todo ello, hemos investigado posibles mecanismos de neuroprotección en un modelo animal y celular de la enfermedad.

Hemos estudiado en ratones R6/1 los efectos de la supresión parcial de la parkina, una E3-ubiquitin ligasa cuyo déficit es responsable de la enfermedad de Parkinson familiar autosómico recesivo. Los ratones dobles mutantes (R6/1/PK^{+/-}) no mejoran con respecto a los R6/1 en ninguno de los parámetros estudiados. A nivel motor, molecular y de fenotipo están igual o peor que los ratones R6/1. A continuación estudiamos el efecto neuroprotector de diferentes sustancias sobre la enfermedad de Huntington. El aceite de oliva virgen extra fue suministrado a ratones R6/1 sintomáticos y asintomáticos y se observó una mejoría en ciertos parámetros de conducta, en la patología molecular y observamos una disminución de las inclusiones de huntingtina en estriado e hipocampo. Hemos estudiado el efecto del fármaco estabilizador de dopamina (-)-OSU6162 en cultivos celulares de neuronas estriatales inmortalizadas STHdH^{Q7/Q7} y STHdH^{Q111/Q111}, observando una protección frente a daño oxidativo y mitocondrial tanto en células control (Q7) como en células mutadas (Q111). Hemos observado también que el medio secretado por células de glía en situaciones de privación de suero (medio condicionado de glía), protege y regenera las células mutadas sometidas a estrés oxidativo y daño mitocondrial. En conclusión, hemos estudiado una serie de sustancias que deberían ser estudiadas en otros modelos de la enfermedad y que podrían ser potenciales agentes terapéuticos en los pacientes con Huntington.

SUMMARY

Huntington's disease is a neurodegenerative disease which is inherited in an autosomal dominant pattern, characterized by motor, cognitive and behavioral signs. This disease is caused by a CAG triplet expansion which encodes an expanded poliglutamine chain in the N-terminal region of the huntingtin protein. The physiological function of this protein and its role in the pathogenesis of Huntington's disease is still unknown. Mutant huntingtin changes its cellular localization, promotes cytoplasmatic and nuclear inclusions, reduces the mitochondrial activity, activates some caspases and other pro-apoptotic molecules, promotes excitotoxicity, alters the proteasome function, produces metabolic deficits, decreases the release and synthesis of neurotrophic factors and produces oxidative damage. Therefore, we investigated possible mechanisms of neuroprotection in an animal and cellular model of the disease.

We studied the effects of partial suppression of parkin protein in R6/1 mice. Parkin is an E3-ubiquitin-ligase and its deficit causes the recessive autosomic familiar Parkinson's disease. The double mutant mice (R6/1/PK^{+/-}) don't improve in motor, molecular and phenotypic characteristics compared with R6/1 mice, the results are similar or worse in double mutant mice than in R6/1 mice. Next, we studied the neuroprotector effect of different compounds in Huntington's disease models. The extra virgin olive oil was administered in the daily diet of R6/1 and WT mice and we observed an improvement in the body weight and a decrease in the number of huntingtin inclusions in striatum and hippocampus of R6/1 mice. We investigated the neuroprotection effect of a dopaminergic stabilizer, (-)-OSU6162, in cell cultures of immortalized neurons (STHdH^{Q7/Q7} and STHdH^{Q111/Q111}). We observed that (-)-OSU6162 reverts completely or partially the oxidative and the mitochondrial damage in control Q7 and in mutant Q111 cells. We also observed that the glia cells in serum deprivation conditions, produce a glia conditioned medium, and this medium protects and regenerates the mutant Q111 cells after the exposure to different neurotoxins. In conclusion, we have studied the neuroprotective effect of determinate substances that should be studied in other models of the disease and they could be potential therapeutic agents in patients with Huntington's disease.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN E HISTORIA

La Enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante (Figura 1) caracterizada por numerosos síntomas, incluyendo pronunciados problemas motores (corea, distonia y bradiquinesia), daño cognitivo y alteraciones psiquiátricas (Harper, 1992). Los síntomas suelen aparecer a mediana edad y progresan de manera inexorable hasta que se produce la muerte unos 15-20 años después del inicio de la enfermedad (Vonsattel et al., 2011). La enfermedad aparece como consecuencia de la expansión de la repetición del triplete CAG en el gen de la proteína huntingtina (Andrew et al., 1993).

La enfermedad de Huntington fue descrita por Waters en 1842 y fue en el año 1872 cuando George Huntington dio a conocer todas sus características, aunque es posible que en años anteriores ya existiesen referencias más o menos completas de la enfermedad. Durante muchas décadas se la denominó corea de Huntington, hasta la década de los ochenta-noventa, cuando se comprobó que no sólo existía corea sino muchos síntomas y signos no-motores, y se la denominó enfermedad de Huntington (Bruyn, 1968). En el año 1993 se descubrió el gen de la huntingtina situado en el cromosoma 4p16.3 (CollaborativeResearchGroup, 1993).

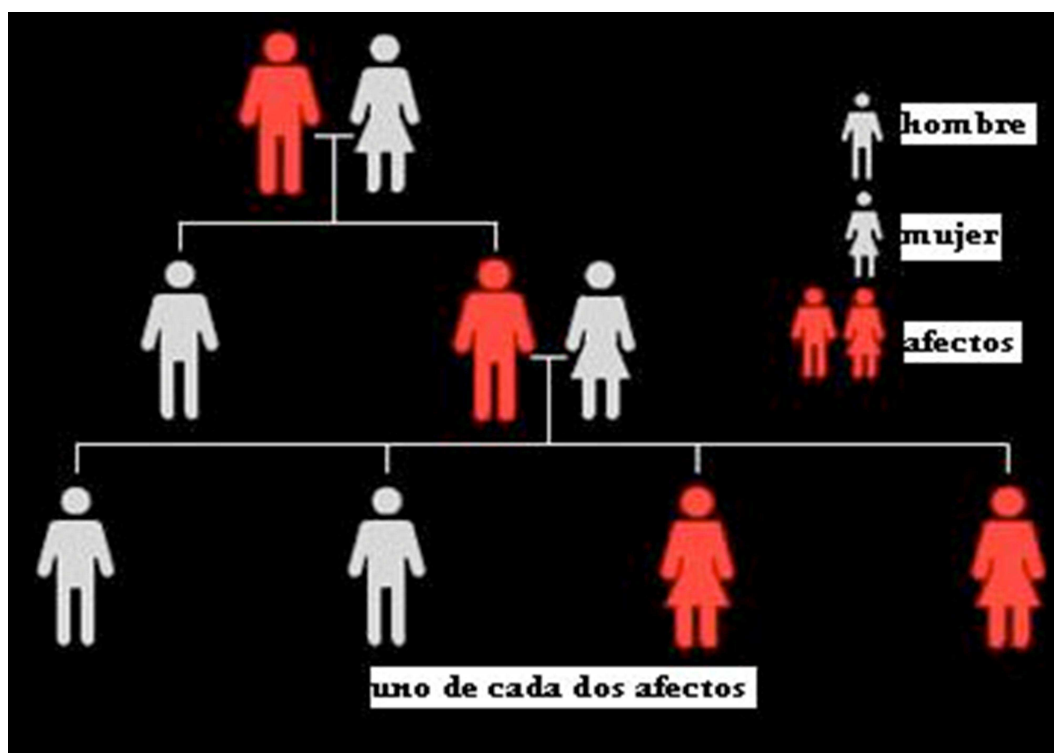


Figura 1. Esquema de la transmisión genética de la enfermedad de Huntington

1.1 Datos clínicos

- Epidemiología

La enfermedad de Huntington tiene una prevalencia en la población caucásica de 10 sobre 100.000. En Japón, la prevalencia es mucho menor, es un décimo de la prevalencia de los caucásicos (Bates et al., 2002). La enfermedad se desarrolla cuando el sujeto posee más de 38 repeticiones del triplete CAG y la edad a la cual comienzan los síntomas suele ser entre los 35 y 50 años, pero este rango puede variar desde 1 a 85 años o más (Vonsattel and DiFiglia, 1998). Los primeros síntomas motores de la enfermedad son los movimientos anormales en partes distales del cuerpo, como en los dedos de las manos y pies, e incluso en pequeños músculos faciales (Roos, 2010). Se han publicado casos dudosos de la enfermedad de Huntington en sujetos con un alelo expandido del gen de la huntingtina con un número de tripletes CAG inferior a 35 (Ha and Jankovic, 2011; Maat-Kievit et al., 2001).

- Fenomenología clínica

La corea es el desorden motor más característico de esta enfermedad, y se describe como movimientos anormales breves, involuntarios y que aparecen de manera impredecible en todas las partes del cuerpo (Quinn and Schrag, 1998). Conforme avanza la enfermedad, estos movimientos tienden a disminuir su intensidad y son reemplazados por rigidez, hipoquinesia y aquinesia asociados a posturas distónicas, que llevan al paciente a una disminución de su actividad o bradiquinesia (Kremer et al., 1992; Roos, 2010).

La enfermedad de Huntington juvenil se denomina variante Westphal y, al contrario que los pacientes con enfermedad de Huntington típica, la variante juvenil no presenta corea. El número de repeticiones CAG es superior a 55 y suele aparecer antes de los 20 años. Esta variante se caracteriza por la combinación de parkinsonismo con aquinesia y rigidez progresiva, distonía, ataxia, demencia y alteraciones psiquiátricas (Gonzalez-Alegre and Afifi, 2006; Siesling et al., 1997).

El daño cognitivo juega un papel principal en el deterioro funcional y la pérdida de autonomía de los pacientes. Puede preceder a los síntomas motores o puede ocurrir durante el transcurso de la enfermedad, y puede terminar en demencia y disfunción ejecutiva (Bamford et al., 1995; Ho et al., 2003). Los pacientes con Huntington tienen tendencia a la irritabilidad, agitación, apatía, ansiedad, aislamiento social, abuso de alcohol y trastornos obsesivo-compulsivos sociopáticos incluyendo los sexuales (Cummings and Cunningham, 1992; Kirkwood et al., 2002; Paulsen et al., 2001). Los pacientes con esta enfermedad tienen un riesgo de suicidio diez veces mayor que la población normal. Las

alteraciones del sueño y la pérdida de peso progresiva son también frecuentes en los pacientes (Aziz et al., 2008; Morton et al., 2005; Videnovic et al., 2009).

- Neuropatología

En cuanto a la neuropatología de la enfermedad, aunque existen lesiones en la corteza e hipocampo, las lesiones más graves de esta enfermedad se encuentran en los ganglios basales. Todas las regiones cerebrales, incluyendo los ganglios basales, juegan un papel importante en el control del movimiento voluntario. Los ganglios basales incluyen el núcleo caudado, el accumbens, el putamen, el globo pálido (externo e interno), el núcleo subtalámico y la sustancia negra (Herrero et al., 2002). El estriado (núcleo caudado y putamen) es el componente más voluminoso de los ganglios basales y actúa como modulador de la información de aferencias sensomotoras, cognitivas y emocionales para el control óptimo del comportamiento (Graybiel et al., 1994; Reiner et al., 1988). El estriado está interconectado con otros núcleos subcorticales involucrados en la regulación del movimiento o los impulsos en contextos particulares (Balleine et al., 2009). Recibe aferencias excitatorias glutamatérgicas procedentes de la corteza y del tálamo así como aferencias dopaminérgicas procedentes de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (substantia nigra pars compacta) (Bolam et al., 2000; Miller and Bezprozvanny, 2010). El estriado está compuesto mayoritariamente por neuronas de proyección GABAérgica con dendritas con espinas sinápticas y por grandes interneuronas de fenotipo colinérgico en la mayor parte de los casos. Estas neuronas medianas espinosas (NMEs) poseen una elevada conectividad sináptica con neuronas glutamatérgicas distribuidas a lo largo de la corteza cerebral y el tálamo (Bolam, et al., 2000; Doig et al., 2010; Vonsattel and DiFiglia, 1998). Tanto las aferencias glutamatérgicas como la dopaminérgicas, convergen en microcircuitos estriatales y conforman la actividad de las NME, que comprenden el 98% de la población neuronal en el estriado y forman un único output desde el estriado a otros núcleos de los ganglios basales (Kreitzer and Malenka, 2008; Rymar et al., 2004). (Figura 2).

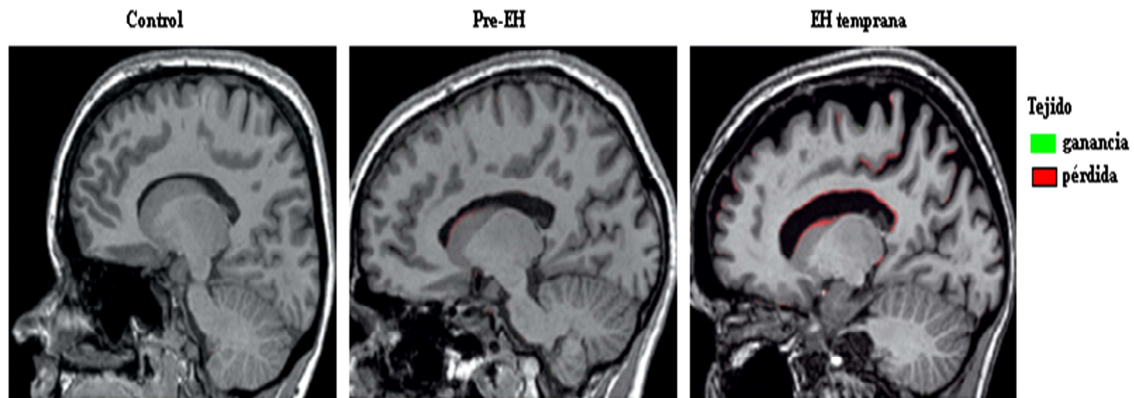


Figura 2. Imágenes de resonancia magnética (RM) de individuos control, portadores de la mutación y pacientes con la enfermedad de Huntington. (Modificado de Weir et al., 2011). Cortes sagitales de cerebro donde se observa la pérdida de tejido en zonas como la corteza cerebral y el estriado, así como el aumento del tamaño de los ventrículos en los pacientes.

Una de las mayores evidencias de la degeneración de estas neuronas espinosas, se muestra por la ganancia/pérdida de función de la proteína huntingtina (Htt), lo que provoca su acumulación en forma de inclusiones intranucleares que aparecen en las NMEs de manera característica en la enfermedad de Huntington (Vonsattel and DiFiglia, 1998).

2. PATOGÉNESIS

2.1. La proteína huntingtina

La huntingtina es una proteína de 3144 aminoácidos. El dominio de poliglutaminas (poliQ) normalmente contiene de 5 a 30 residuos de glutamina en la población sana, los sujetos que contienen 31-35 glutaminas se consideran pre-mutacionales, mientras que en pacientes con enfermedad de Huntington los residuos contienen más de 35 y en la mayoría de los casos 38 glutaminas (Li and Li, 2004). La expresión ubicua de la huntingtina en todos los tejidos y su extendida localización subcelular, dificulta la identificación del mecanismo patogénico primario. La huntingtina está asociada con numerosos orgánulos celulares como el núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vesículas sinápticas y mitocondrias (DiFiglia et al., 1995; Sharp et al., 1995). La proteína huntingtina no mutada juega un papel importante en la función sináptica, es necesaria en el período post-embrionario, puede tener efectos antiapoptóticos y podría tener un efecto protector frente a la huntingtina mutada (Rubinsztein, 2002). Se considera una proteína esencial que controla el tráfico intracelular, rutas de señalización celular, y la actividad de la transcripción de algunos genes, todo ello para mantener la homeostasis neuronal (Roze et al., 2011).

2.2 Posibles mecanismos patogénicos de la enfermedad de Huntington

La huntingtina es cortada por numerosas proteasas intracelulares, incluyendo caspasas, y su procesamiento proteolítico juega un papel esencial en la patofisiología de la enfermedad. El fragmento que resulta del corte en el extremo N-terminal de la proteína mutada, es mucho más tóxico que la proteína mutada completa. Estos fragmentos cortados con expansiones grandes de poliglutaminas pueden agregarse en oligómeros tóxicos (Huang et al., 1998; Perutz et al., 2002).

Los agregados de huntingtina se encuentran en el cerebro de los pacientes con Huntington y en numerosos modelos animales de la enfermedad. Estos agregados alteran el funcionamiento de las neuronas secuestrando la huntingtina no mutada o asociándose a proteínas implicadas en la transcripción o en el transporte (Figura 3).

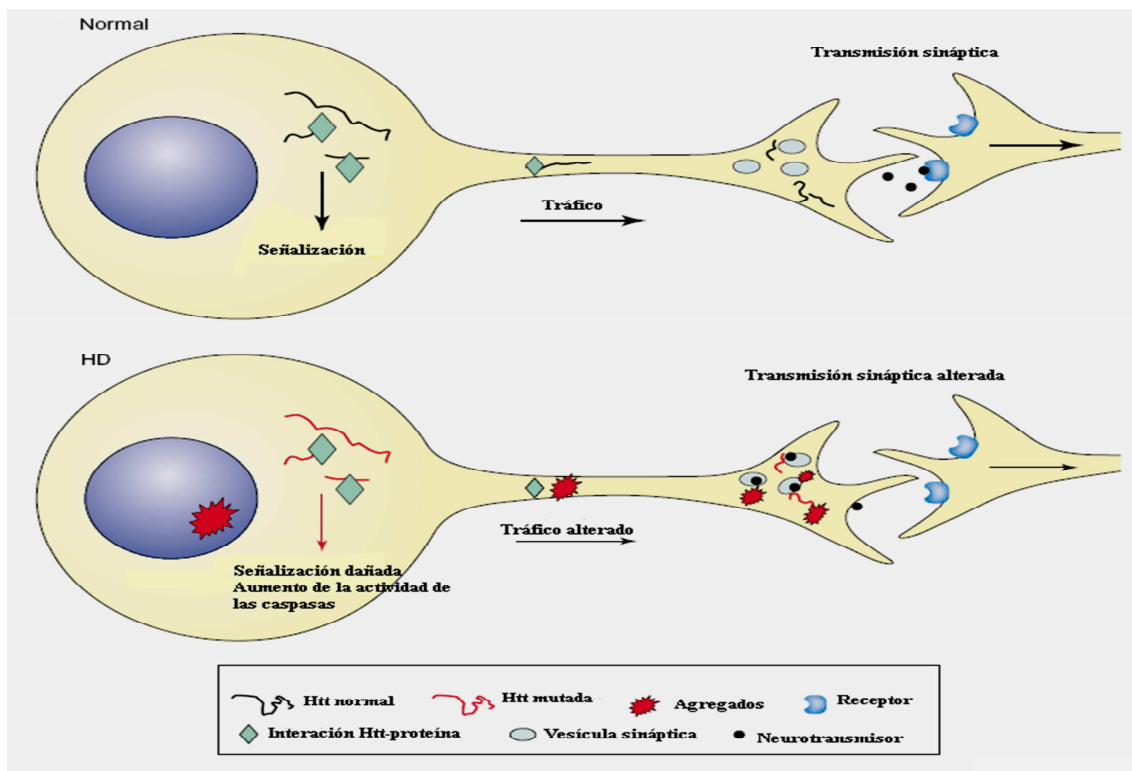


Figura 3. Efectos de la huntingtina mutada en la transmisión sináptica. (Modificado de Li and Li 2004). La huntingtina normal interacciona en el cuerpo neuronal con determinadas proteínas y regula la señalización celular. También puede interaccionar con proteínas involucradas en el tráfico celular, endocitosis vía receptor y reciclaje de vesículas sinápticas en los terminales axónicos, lo cual es importante para una transmisión sináptica normal. La huntingtina mutada interacciona de manera anormal con otras proteínas, lo que conlleva a una alteración en las rutas de señalización y un incremento de la actividad de las caspasas. La huntingtina mutada forma agregados que alteran las interacciones con otras proteínas provocando un daño la señalización celular.

En el siguiente esquema vemos posibles mecanismos patogénicos de la huntingtina (Figura 4):

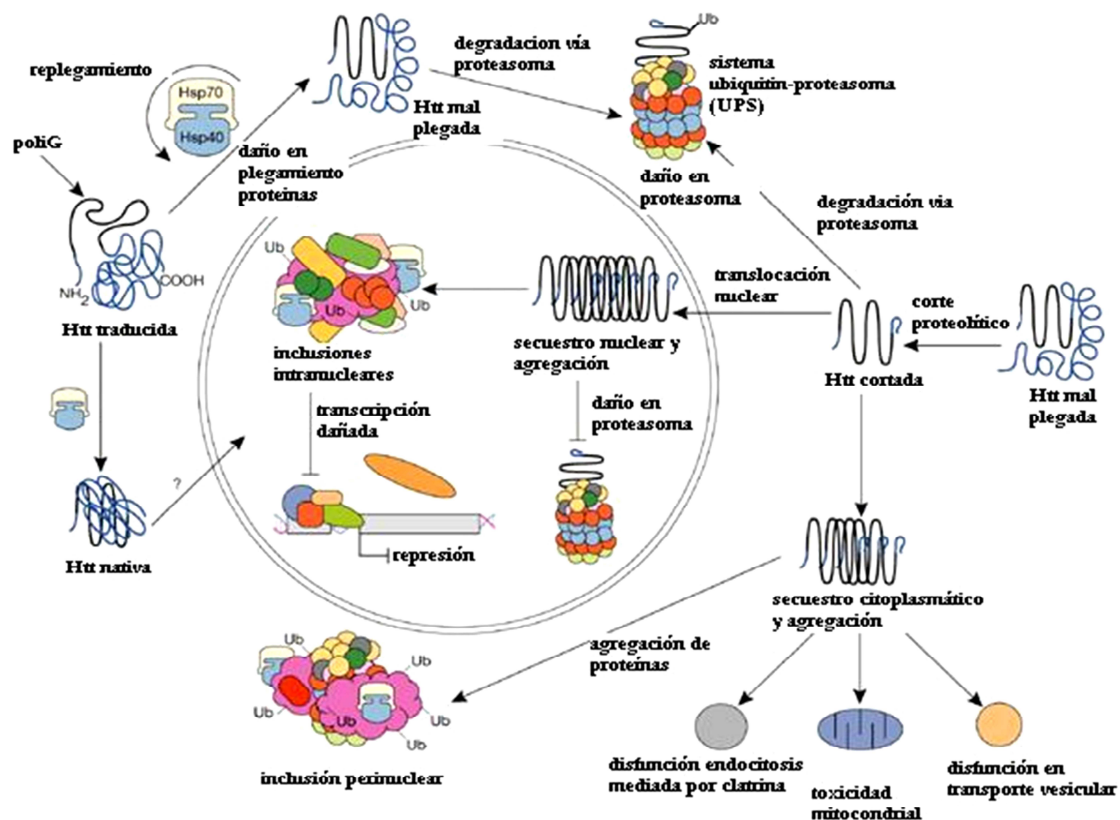


Figura 4. Modelo de la patogénesis celular en la enfermedad de Huntington. (Modificado de Landles and Bates, 2004)

La toxicidad provocada por los agregados de huntingtina mutada, puede llevar a un defecto en la síntesis de ARN, supervivencia celular, tráfico vesicular dependiente de microtúbulos o en el sistema ubiquitina proteasoma (UPS) (DiFiglia et al., 1997; Li and Li, 2004; Martindale et al., 1998; Steffan et al., 2000; Trushina et al., 2004). La toxicidad de los agregados también depende del compartimento celular donde se localicen, por ejemplo serán más tóxicos en las neuritas que en el núcleo (Lee et al., 2004; Li et al., 2000). Estos agregados no pueden ser eliminados por el UPS, y por ello alteran la maquinaria de “limpieza” celular (Bennett et al., 2007; Hunter et al., 2007). Los niveles basales de la actividad UPS son menores en las neuronas si lo comparamos con las células de glía, lo que podría explicar la mayor acumulación de agregados en las neuronas (Tydlacka et al., 2008).

Cultivos celulares y estudios bioquímicos indican que la huntingtina mutada puede interferir con la transcripción de genes (Cattaneo et al., 2005). Existe una desregulación en numerosos genes que codifican para receptores de neurotransmisores, enzimas y proteínas implicadas en la estructura de las neuronas, respuestas a estrés y transporte axonal (Luthi-Carter et al., 2000; Roze, et al., 2011). Más del 80% de los genes “estriales enriquecidos”

(genes con una expresión relativa muy alta en el estriado comparado con otras regiones cerebrales) ven disminuída su expresión tanto en modelo de ratón como en cerebros postmortem de pacientes con enfermedad de Huntington (Desplats et al., 2006).

La desregulación transcripcional puede encontrarse en regiones genómicas de gran tamaño de manera coordinada y está asociada con la progresión de la enfermedad. Uno de los genes “diana” que ven disminuída su transcripción en la enfermedad es el BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Zuccato and Cattaneo, 2009). La disminución del BDNF en estriado de ratones empeora con el fenotipo, mientras que la expresión elevada de BDNF en cerebro atenúa el fenotipo de la enfermedad de Huntington (Canals et al., 2004; Gharami et al., 2008).

La excitotoxicidad es la excesiva estimulación de receptores de aminoácidos excitadores, especialmente del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), y es un mecanismo celular no autónomo que juega un papel importante en Huntington (Cowan and Raymond, 2006). En la enfermedad de Huntington, existen niveles muy elevados de glutamato en el estriado y esto conlleva a una reducción de la recaptación glial de este aminoácido (Lievens et al., 2001). La homeostasis de Ca^{2+} está alterada en las neuronas estriatales, lo que conlleva a la muerte celular a través de numerosas rutas de señalización. La implicación prioritaria del receptor de NMDA en excitotoxicidad es debido precisamente a su alta permeabilidad a calcio y su baja cinética de activación/inactivación (Rothman and Olney, 1995).

Otro de los mecanismos producidos por la toxicidad de la huntingtina mutada es el déficit en el metabolismo energético por disfunción mitocondrial. La mitocondria es el orgánulo donde se produce la mayor cantidad de energía de las células eucariotas, producen el ATP, la primera fuente de energía celular. La mitocondria también posee algunos reguladores de la muerte celular como la familia de proteínas Bcl-2, citocromo C y otros factores pro-apoptóticos. Cuando se liberan al citoplasma, estos factores disparan programas de muerte celular. La disfunción en el metabolismo energético mitocondrial conlleva a una reducción de la producción de ATP, desregulación en la homeostasis de calcio y se potencia la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que podrían también producir la ejecución de la muerte celular programada (Beal, 2005; Tabrizi et al., 2000). La sobreexpresión de la proteína huntingtina con numerosas repeticiones de glutaminas dentro del rango patológico, incrementa la muerte celular inducida por estrés oxidativo en cultivos celulares y se correlaciona con una mayor activación de la caspasa-3, lo que no sucede con la huntingtina con un número normal de glutaminas (Wang et al., 2009; Wang et al., 2008). También se han observado anomalías en la cadena transportadora

de electrones y en la maquinaria glicolítica. Los pacientes con Huntington tienen reducido el consumo de glucosa en el cerebro, especialmente en los ganglios basales, así como un aumento en la concentración de lactato en cortex occipital (Grafton et al., 1992; Jenkins et al., 1998). Los mecanismos por los cuales se produce este déficit energético incluyen daño en la fosforilación oxidativa, estrés oxidativo, daño en el manejo del calcio mitocondrial, anomalías en el tráfico mitocondrial, descenso de la glucólisis y un déficit en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (succinato deshidrogenasa, SDH), y complejo IV (citocromo C oxidasa) (Napolitano et al., 2004; Rosenstock et al., 2010).

El transporte vesicular está alterado en la enfermedad y este hecho está relacionado con la disfunción sináptica (Caviston and Holzbaur, 2009; Gunawardena et al., 2003). La huntingtina regula las funciones motoras del citoesqueleto, incluyendo transporte vesicular y reciclaje gracias a la interacción con HAP1, HAP40 (proteínas asociadas a huntingtina de 40 KDa) y con dineína. Los fallos en el transporte podrían explicarse debido al fallo en la interacción entre la huntingtina mutada y estas proteínas motoras o a consecuencia de los agregados neuríticos que pueden actuar bloqueando estas vías (Caviston and Holzbaur, 2009; Szebenyi et al., 2003). La liberación de BDNF procedente de aferencias corticales que proporciona un importante abastecimiento neurotrófico sobre las células estriatales, está dañado en esta enfermedad. Así pues, la alteración en el transporte axonal de BDNF debido a la huntingtina mutada, provoca un déficit en las neuronas corticales que afecta a la liberación de éste en el estriado (Gauthier et al., 2004).

Las proteínas mal plegadas son eliminadas de las células mediante dos sistemas: el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) y mediante la autofagia (Ciechanover, 2005; Levine and Kroemer, 2008). El UPS principalmente degrada proteínas de vida corta tanto nucleares como citoplasmáticas, marcándolas con cadenas de poliubiquitina, sin embargo, el poro estrecho del proteasoma, impide la entrada de agregados proteicos grandes y organelas (Li et al., 2010). La proteína parkina es una ubiquitin E3-ligasa de 465 aminoácidos y sus mutaciones producen la enfermedad de Parkinson familiar (Hoenicka et al., 2002; Lucking et al., 2000). Las mutaciones y polimorfismos de parkina, podrían aumentar el riesgo de padecer parálisis supranuclear progresiva (PSP), una enfermedad caracterizada por poseer patología tau, por lo que, la función anómala de la parkina no solo produce parkinsonismo sino que podría agravar los eventos moleculares que tienen lugar cuando se acumulan en cerebro proteínas anómalas (Morales et al., 2002; Ros et al., 2008). Por lo tanto, en este trabajo hemos intentado comprobar si la delección parcial de parkina en ratones R6/1 modelo de la enfermedad de Huntington, agrava la sintomatología propia de la enfermedad. La macroautofagia, generalmente denominada autofagia, es la ruta de

degradación celular utilizada para proteínas citoplasmáticas de larga vida, complejos proteicos o para organelas dañadas (Levine and Kroemer, 2008). La degradación via autofágica envuelve numerosas proteínas, entre las cuales se incluye la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera-3 LC3 que posee dos isoformas (LC3-I y LC3-II) (Kabeya et al., 2000). Durante la activación de la autofagia, LC3-I es procesado produciendo LC3-II fosfatidiletanolamina modificada, la cual se asocia específicamente con el autofagosoma de la membrana.

3. MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

3.1. Modelos animales de la enfermedad de Huntingtgon

En la actualidad, existe aún cierto desconocimiento acerca de todos los mecanismos implicados en la patología de la enfermedad, el tratamiento para retrasar el inicio de la enfermedad o los mecanismos para frenar su progresión. Por ello, los modelos animales pueden imitar síntomas clínicos y trastornos neurobiológicos de la enfermedad y pueden ser una alternativa para el estudio de la etiopatología de la enfermedad de Huntington y el desarrollo de nuevas terapias (Wang and Qin, 2006).

3.1.1. Modelos de lesión excitotóxica:

Como hemos explicado anteriormente, la excitotoxicidad se produce cuando elevadas concentraciones de glutamato interaccionan con sus respectivos receptores de membrana o cuando hay un déficit de función del transportador o un cambio de afinidad, lo que provoca efectos nocivos para las células. La destrucción de neuronas estriatales producida por excitotoxinas está basada principalmente en procesos de apoptosis (Qin et al., 1996). Las lesiones estriatales pueden reproducir algunos aspectos comportamentales de la enfermedad como hiperquinesias, trastorno de habilidades motoras y déficits en el aprendizaje espacial y función ejecutiva en ratas (Sanberg and Coyle, 1984). El ácido kaínico, agonista glutamatérgico, es capaz de provocar lesiones en el estriado de ratón similares a las ocurridas en la enfermedad de Huntington (Beal et al., 1985; Roberts et al., 1993). Otro modelo de excitotoxicidad es el producido por la inyección intraestriatal de ácido quinolínico, un agonista de glutamato NMDA-selectivo y cuyo precursor endógeno es el triptófano y que induce preferentemente la degeneración de neuronas GABAérgicas (Roberts et al., 1993). El uso de estos modelos ha permitido utilizar antagonistas del glutamato en el tratamiento de la enfermedad como por ejemplo el riluzol (Bensimon et al.,

2009) o la amantadina (Qin et al., 2005), aunque estos fármacos, hasta la fecha, no han obtenido beneficios terapéuticos.

3.1.2. Modelos de lesión por toxinas mitocondriales:

La inyección de varias toxinas mitocondriales como rotenona, malonato, MPP⁺, etc. en el estriado de ratas, produce un aumento de la formación de lactato, pérdida de ATP y una degeneración neuronal debido a mecanismos de interrupción del metabolismo energético de las mitocondrias y una excitotoxicidad secundaria (Wang and Qin, 2006). El ácido 3 nitropropiónico (3-NP) es un inhibidor del complejo II succinato deshidrogenasa (SDH) de la cadena respiratoria mitocondrial que administrado en ratones produce lesiones en el estriado y en humanos en caudado y putamen (Brouillet et al., 2005) y se utiliza como modelo de la enfermedad.

3.1.3. Modelos de ratones transgénicos:

Estos modelos incluyen ratones transgénicos, knock-in, knock-out y modelos con la extensión de poliQ insertada mediante virus.

Los modelos transgénicos se caracterizan porque el gen mutado, o parte de él, se inserta de manera controlada en el genoma del ratón, permitiendo así la expresión de la proteína mutante además de la proteína huntingtina endógena normal. Existen dos categorías importantes de ratones transgénicos. La primera incluye a los ratones que expresan fragmentos N-terminales de la huntingtina, normalmente los primeros 1 o 2 exones del gen humano de la huntingtina que contiene la expansión de poliQ. La segunda categoría son los ratones transgénicos que expresan el gen completo de la enfermedad con la extensión de poliQ (Hickey and Chesselet, 2003).

- **Ratones transgénicos con fragmentos de huntingtina:** Al primer ratón transgénico de estas características se le llamó ratón R6. Se generó gracias a la sobreexpresión del exón 1 del gen humano de la huntingtina con 141-157 repeticiones. Existen 6 líneas, donde 4 de ellas contienen repeticiones de CAG de un tamaño mayor que la enfermedad de Huntington juvenil en humanos y se denominan: R6/1, (CAG = 115); R6/2, (CAG = 145); R6/5, (CAG = 135-156) y R6/0, (CAG = 142). Las edades de inicio de la enfermedad son de 2 meses para los R6/2 y de 4-5 meses para los R6/1 (Mangiarini et al., 1996; Sathasivam et al., 1999). En nuestro laboratorio hemos utilizado la línea transgénica R6/1 cedida amablemente por el Prof. José Lucas (Centro de Biología

Molecular, UAM, España). Todos los ratones transgénicos comparten la pérdida de peso progresiva conforme avanza la enfermedad.

Los ratones R6/1 contienen 115 repeticiones de poliQ y presentan daños a nivel nuclear y citoplasmático en el cuerpo estriado y en hipocampo. La edad de inicio de los síntomas motores en los ratones R6/1 es de 15-21 semanas (4-5 meses) y suelen morir en torno a las 32-40 semanas (8 meses) (Mangiarini et al., 1996). Estos ratones tienen una reducción en la unión a receptores A_{2a} adenosina, D1 dopamina, D2 dopamina y una reducción en los niveles de DARPP-32 y N-acetilaspártato en el estriado (Iannicola et al., 2000; van Dellen et al., 2000). Al igual que en la línea R6/2, estos ratones presentan una disminución en la expresión del receptor CB1 de cannabinoides pero no presentan hiperglicemia como los R6/2 (Blazquez et al., 2011; Perez-Severiano et al., 2000). En cuanto a su comportamiento, los ratones R6/1 presentan déficits motores en la marcha al reducirse la longitud de la zancada, déficits en coordinación motora medida por el Rotarod, donde van reduciendo su permanencia conforme avanza la enfermedad, disminuyen también los niveles de ansiedad y su capacidad exploratoria (Naver et al., 2003; Rubio et al., 2009).

Otros ratones que expresan fragmentos N-terminales de la proteína huntingtina son los modelos transgénicos N171-82Q, que contienen el fragmento de 171 aminoácidos o el modelo N586-82Q que contiene el fragmento de caspasa 6 o 586 aminoácidos de la región N-terminal. Estos dos modelos presentan un agravamiento de la enfermedad más rápido, comparten los mismos síntomas motores que las otras líneas y los animales mueren a edades más tempranas (Heng et al., 2008).

- **Ratones transgénicos con la proteína huntingtina completa:** Estos modelos murinos contienen la proteína huntingtina humana completa. Los modelos más utilizados son los ratones YAC (Yeast Artificial Chromosome) donde el gen completo de la huntingtina humana se inserta en un cromosoma de levadura y éste se integra en el genoma murino. El ratón YAC128 muestra una atrofia cerebral selectiva y pérdida neuronal. No aparecen apenas agregados de huntingtina mutada y presenta problemas motores a los 3 meses de edad y mueren a edades similares a los ratones control (Heng et al., 2008).

3.1.4. Modelos de ratones knock-in:

Al contrario que los ratones transgénicos, estos ratones expresan la proteína huntingtina mutada en un contexto murino genómico y proteico apropiado con un promotor Hdh. Inicialmente el uso de estos ratones no fue aceptado ya que no

desarrollaban ni el comportamiento ni el fenotipo tan marcado que aparecía en los ratones transgénicos, por lo que se desarrollaron ratones knock-in con más repeticiones donde la progresión del fenotipo y la patología se desarrollan de manera más lenta (Menalled et al., 2009). Todos estos ratones contienen el promotor Hdh, y poseen el exón 1 quimérico ratón/humano que codifica para un determinado número de glutaminas dependiendo del ratón. Los ratones se denominan HdhQ94, HdhQ140, HdhQ111 y Hdh (CAG) 150 (éste contiene el exón enteramente de ratón) (Heng et al., 2008; Wheeler et al., 1999).

3.1.5 Modelos de ratones knock-out:

Este modelo no es bueno ya que la homocigosis del gen huntingtina en ratones knock-out provoca la muerte de los embriones. Esto indicó que no era un buen modelo de la enfermedad pero que la huntingtina tiene un papel esencial en el desarrollo embriológico (Duyao et al., 1995).

3.1.6 Modelos en *Drosophila melanogaster* y *Caenorabditis elegans*:

La mosca *Drosophila melanogaster* es uno de los mejores modelos invertebrados para representar a los organismos superiores. Comparte el 50% de sus genes con el ser humano y contiene un sistema nervioso completo y funcional con una arquitectura que separa funciones específicas como la visión, la olfacción, el aprendizaje y la memoria. La embriogénesis en esta mosca dura aproximadamente 1 día y la neurogénesis comienza alrededor de las 5 horas y concluye a las 15 horas (Marsh et al., 2003). Por ello, es un buen modelo al ser rápido y poder tener un elevado número de sujetos, pero hay que superar obstáculos prácticos como la manipulación automatizada de las moscas y el hecho de que éstas no son accesibles a los fármacos administrados externamente (Wang and Qin, 2006).

EL nematodo *Caenorabditis elegans*, es un modelo ya establecido en biología del desarrollo. Como no contiene un homólogo de la huntingtina o de fragmentos de poliQ, los fenotipos transgénicos en gusanos pueden atribuirse a transgenes de poliQ. En este modelo la expansión de glutaminas provoca daños en el sistema olfativo y mecano-sensorial (Parker et al., 2001).

3.2. Modelos celulares de la enfermedad de Huntington

Las líneas celulares son modelos útiles para poder estudiar a nivel bioquímico la patogénesis de la enfermedad. Como hemos comentado anteriormente, en la EH existe gran cantidad de genes que sufren modificaciones, por ello, los modelos celulares nos ayudan a diseñar estrategias de expresión de genes para poder estudiar sus efectos. Una

línea clonal e inducible que expresa la huntingtina mutada, puede ofrecer un modelo controlado y estable a nivel genético y transcripcional donde poder realizar estudios genéticos (Kim et al., 1999).

Existen numerosos modelos celulares para la enfermedad de Huntington. Nosotros en el laboratorio hemos utilizado un modelo celular derivado de embriones en estadio E14 de ratones wild-type y knock-in Hdh^{Q111}. Se trata de líneas celulares estriatales condicionalmente immortalizadas donde las wild type contienen la huntingtina no mutada con 7 repeticiones de glutamina (STHdh^{Q7/Q7}) y las células STHdh^{Q111/Q111} contienen la proteína huntingtina mutada con 111 repeticiones de glutamina (Trettel et al., 2000). Estas células reproducen numerosos efectos observados en esta enfermedad como el daño en el metabolismo energético, disminución en la producción de ATP y en el ratio ADP/ATP (Gines et al., 2003; Seong et al., 2005; Trettel et al., 2000), poseen una elevada sensibilidad al 3-NP (Mao et al., 2006; Ruan et al., 2004) y numerosos defectos en la cadena respiratoria mitocondrial (Milakovic and Johnson, 2005).

4. TRATAMIENTOS PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

4.1. Tratamientos actuales en clínica

Existen numerosos tratamientos a nivel sintomático para esta enfermedad, pero a día de hoy ninguno es capaz de retrasar su aparición ni de curarla definitivamente. Los fármacos utilizados en clínica son los siguientes: Tetrabenazina (TBZ) para tratar la corea, principal síntoma en pacientes con enfermedad de Huntington. Es el único fármaco aprobado para tratar la enfermedad a día de hoy (Frank, 2010). La TBZ es un fármaco depletor selectivo de monoaminas centrales como la dopamina y actúa inhibiendo su liberación a través de la unión selectiva y reversible al transportador de monoaminas tipo II (VMAT2). Tiene gran afinidad de unión en el núcleo caudado y putamen, las áreas más afectadas en la enfermedad de Huntington (Paleacu, 2007). Se han realizado varios ensayos clínicos sin mucho éxito con la TBZ, observando numerosos efectos secundarios como la depresión, somnolencia, agitación e hiperquinesias, y no se han encontrado diferencias significativas entre TBZ y placebo (Huntington Study, 2006). La prídopidina es un fármaco que ha demostrado en un ensayo clínico en fase III que produce una mejoría global de los trastornos motores sin efectos secundarios notables (de Yebenes et al., 2011).

Existen otros tipos de fármacos, como las benzodiacepinas, para tratar síntomas como las mioclonías (movimientos involuntarios, breves que provocan una contracción muscular

brusca), las distonías (movimientos en los cuales contracciones sostenidas del músculo provocan torsiones, movimientos repetitivos o posturas anormales), corea, rigidez o espasticidad. Algunos anticonvulsivantes también se utilizan para tratar las mioclonías, y la levodopa, amino ácido precursor de dopamina muy utilizado en la enfermedad de Parkinson, se utiliza en la enfermedad de Huntington para tratar la rigidez, especialmente en su variante juvenil (Ross and Tabrizi, 2011).

Otros de los síntomas que pueden aparecer en esta enfermedad, son los relacionados con trastornos psiquiátricos. La psicosis y la irritabilidad son tratados con neurolépticos como la olanzapina, aunque los efectos secundarios son muy numerosos y pueden producir parkinsonismo o disquinesias (Adam and Jankovic, 2008). La depresión, ansiedad, comportamientos obsesivos compulsivos y la irritabilidad se suelen tratar con fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina como la fluoxetina, paroxetina o el citalopram (Ross and Tabrizi, 2011).

4.2. Erradicación o prevención de la enfermedad de Huntington

A día de hoy, aún no existe cura farmacológica para esta enfermedad ni manera de erradicarla definitivamente. Existen tres tipos de procesos de intervención genética en la enfermedad de Huntington: el diagnóstico pre-sintomático, pre-natal y pre-implantacional, todos ellos con el correspondiente consejo genético.

El diagnóstico pre-sintomático, se realiza en individuos con riesgo de ser portadores de la mutación que aún no han desarrollado ninguna sintomatología. Los pacientes pre-sintomáticos portadores del gen mutado, poseen una activación compensatoria de áreas cognitivas motoras y áreas motoras suplementarias caudales. Esto lleva a pensar que estas regiones caudales juegan un papel esencial en aspectos de ejecución y control motor que van aumentando su actividad conforme se aproxima la edad de inicio de los síntomas, compensando esas disfunciones en otras partes del sistema motor (Kloppel et al., 2009).

El diagnóstico pre-natal permite realizar diagnósticos precoces de anomalías congénitas y enfermedades genéticas en el útero y siempre debe estar acompañada del consejo genético. Los métodos utilizados se dividen en dos grupos de técnicas, las no invasivas y las invasivas (Stembalska et al., 2007). Dentro de los procedimientos no invasivos aparecen técnicas de ultrasonido como las ecografías rutinarias de obstetricia, ecografías de alta resolución con estudios de doppler y ecocardiografía del corazón del feto. También se utiliza la resonancia magnética (RM) y los tests en sueros de sangre materna, donde se sabe que existe ADN del feto. Esta última técnica tan novedosa tiene sus limitaciones al sólo ser fiable si el portador de la enfermedad es el padre (Bustamante-Aragones et al., 2008).

Las técnicas invasivas son las más fiables a día de hoy. Estos procedimientos implican el examen directo de tejidos o células fetales e incluyen la toma de muestra de vellosidad coriónica para el análisis de trofoblastos; la amniocentesis donde se analiza el líquido amniótico; y la cordocentesis para el análisis de sangre obtenida del cordón umbilical (Stembalska et al., 2007).

Pero sin duda, el diagnóstico pre-implantacional podría ser el más adecuado para la erradicación de esta enfermedad. Esta técnica consiste en la fertilización *in vitro* y en el análisis genético de los embriones. Se realizan análisis genéticos de células embrionarias y los embriones no portadores de la mutación son re-implantados en el útero materno (Basille et al., 2009). El primer ciclo fue realizado en 1990 en Inglaterra (Handyside et al., 1990).

Los embriones se obtienen a partir de la fecundación *in vitro* (FIV) gracias a la inyección de espermatozoides intracitoplasmático, de esta manera se reduce el riesgo de contaminación paterna. A los 3 días, se biopsia el embrión que constará de ocho células y se analiza genéticamente mediante técnicas genéticas de FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) y mediante PCR de una sola célula. Sólo los embriones sanos se implantarán posteriormente en el útero materno (Basille et al., 2009).

El uso de estas técnicas puede cortar la transmisión de la enfermedad en una familia y disminuir el número de pacientes en una población, pero es probable que no se pueda terminar con la enfermedad porque existen datos que sugieren la producción de nuevas mutaciones en descendientes sanos con expansiones en riesgo o intermedio (Semaka et al., 2010).

4.3. Neurorestauración

La restauración de la estructura cerebral y los circuitos neuronales gracias al trasplante de tejido fetal, es una estrategia de reparación que se sigue investigando en la actualidad. Los precursores neuronales, neuroblastos, son capaces de migrar a determinadas regiones cerebrales y reestablecer automáticamente el daño en los circuitos neurales del cerebro de animales adultos (Lepore et al., 2006). Sin embargo, la eficacia del trasplante neuronal en la enfermedad aún no ha sido establecida. La estrategia consiste en sustituir la pérdida de neuronas estriatales en cerebros afectados, por neuroblastos estriatales y precursores neuronales obtenidos de embriones sanos seleccionados genéticamente. Las autopsias posteriores de estos pacientes transplantados, muestran que la enfermedad no afecta a las células transplantadas que carecen del gen de la huntingtina mutada (Freeman et al., 2000; Gaura et al., 2004). Estudios en pacientes transplantados durante 6 años, muestran una mejora y una

estabilidad en la enfermedad por un período de tiempo de 2 años, debido principalmente a una recuperación del metabolismo cerebral, pero pasado este tiempo, esta mejoría desaparece (Bachoud-Levi et al., 2006), concluyendo que la terapia adecuada debería mezclar estrategias de trasplante con terapias neuroprotectoras.

5. NEUROPROTECCION EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

5.1. Estrategias utilizadas

Existen numerosos estudios acerca de posibles fármacos y mecanismos neuroprotectores en la enfermedad de Huntington en modelos animales. Estos trabajos se basan en la división de los fármacos según las siguientes categorías:

1. Inhibidores de la transmisión excitadora
2. Potenciadores de la función mitocondrial
3. Antioxidantes y bloqueantes de radicales libres
4. Inhibidores de caspasas
5. Reguladores del metabolismo de la glucosa
6. Promotores de la autofagia
7. Inhibidores de la agregación de la Htt mutada

1. Dos de los fármacos más estudiados para combatir la excitotoxicidad son el Riluzol y la Remacemida. El Riluzol es un antagonista de glutamato que inhibe su liberación desde las terminaciones nerviosas, estabilizando la forma inactiva de canales de sodio y bloqueando receptores de NMDA de manera no competitiva. Es capaz de aumentar la supervivencia y alterar la formación de agregados de huntingtina en ratones R6/2 (Schiefer et al., 2002). En pacientes se ha observado que protege frente al hipometabolismo de glucosa en cerebro y aumenta la producción de neurotrofinas (Squitieri et al., 2009) pero no reduce la corea ni mejora los síntomas motores (Landwehrmeyer et al., 2007). La Remacemida es un inhibidor de baja afinidad del receptor NMDA que, combinado con el Coenzima Q₁₀ (cofactor esencial en la cadena respiratoria de electrones mitocondrial que acepta electrones del complejo I y II), son capaces de disminuir agregados de huntingtina, aumentan el volumen del estriado, mejoran la función motora y alargan la vida a ratones R6/2 (Ferrante et al., 2002)

2. Los fármacos Coenzima Q₁₀ y creatina son potenciadores de la función mitocondrial. La creatina es un compuesto natural que, mediante su intermediario

fosfocreatina, provee a la célula de energía en forma de ATP. En ratones potencia la supervivencia celular regulando la homeostasis de numerosas funciones celulares pero en humanos no se ha visto este tipo de beneficios (Ryu et al., 2005). La Metazolamida inhibe la liberación de citocromo C y prolonga la supervivencia en ratones R6/2 (Wang et al., 2008).

3. Los fármacos utilizados como antioxidantes y atrapadores de radicales libres son el ácido lipoico, tocoferol, ibedenona. Este último es análogo sintético de la ubiquinona CoQ10 e inhibe la peroxidación de lípidos mediante la producción de ATP (Gillis et al., 1994).

4. La Minociclina es un antibiótico utilizado como inhibidor de caspasas y de la activación de la microglía. Es un antibiótico con propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas que inhibe la expresión de las caspasas 1 y 2 y prolonga la supervivencia en ratones (Hersch et al., 2003; Wang et al., 2003).

5. El antidepresivo paroxetina actúa inhibiendo la recaptación de serotonina y es capaz de normalizar la hiperglucemia en ratones R6/2, lo que sugiere que la señal serotoninérgica mejora la regulación del metabolismo de la glucosa en ratones. Esto mejora la pérdida de peso corporal. Estos ratones tratados con paroxetina alargan la supervivencia, tardan más en morir (Duan et al., 2004).

6. La rapamicina promueve la autofagia. Es un antibiótico, antifúngico e inmunosupresor. Inhibe la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) y promueve la macroautofagia de los agregados proteicos, atenuando su toxicidad (Sarkar et al., 2008). El disacárido trehalosa también es un activador de autofagia y el tratamiento con ambos fármacos resulta ser beneficioso en la enfermedad de Huntington (Sarkar et al., 2007).

7. Fármacos inhibidores de la agregación de huntingtina mutada son la cistamina y geldanamicina. El primero es un inhibidor de transglutaminasas, que están muy elevadas en EH (Dedeoglu et al., 2002). La geldanamicina es una benzoquinona que activa la chaperona Hsp90 activando así una cascada de proteínas de choque térmico que inhiben la agregación de la huntingtina mutada (Sittler et al., 2001).

5.2. Dietas cetogénicas en la enfermedad de Huntington

El cerebro es uno de los órganos más activos del cuerpo desde el punto de vista metabólico, y es muy eficiente en el metabolismo de la glucosa para la obtención de ATP (Henderson, 2008). En pacientes con Huntington, el metabolismo energético está alterado tanto en cerebro como en músculo esquelético, y los pacientes comienzan a perder peso a pesar de una elevada ingesta de alimentos y un elevado apetito. Las dietas cetogénicas

contienen un alto contenido en grasas y un bajo contenido en azúcares que obligan al cuerpo a utilizar como fuente de glucosa los cuerpos cetónicos y mimetizar así los cambios metabólicos sufridos en el ayuno (Ruskin et al., 2011). Son dietas que se utilizan con éxito en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia y han sido propuestas en la enfermedad de Alzheimer (Henderson, 2008; Jarrett et al., 2008).

Los cuerpos cetónicos son el beta-hidroxibutirato, aceto-acetona y acetona. Estos compuestos son fuentes alternativas de acetil Co-A para entrar en el ciclo de Krebs y producir ATP de manera más eficiente que el proveniente del piruvato (Veech, 2004). Se ha demostrado que las dietas cetogénicas aumentan los niveles de energía celular, potencian la función mitocondrial e inhiben el daño oxidativo (Maalouf et al., 2007).

Estudios recientes han demostrado que el aceite de oliva reduce el daño producido por el ácido 3-nitropropiónico en un modelo de enfermedad de Huntington en rata (Tasset et al., 2011) y que retrasa el comienzo de la pérdida de peso en ratones R6/2 y mejoran su actividad motora (Ruskin et al., 2011). En nuestro laboratorio, decidimos utilizar como agente neuroprotector el aceite de oliva virgen extra e intentar así proporcionar una dieta rica en grasas y estudiar su efecto en los ratones R6/1.

5.3 Estabilizadores dopaminérgicos

La disfunción en el control homeostático de la neurotransmisión límbica de la dopamina, da lugar a estados anormales que caracterizan numerosas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas (Galvan and Wichmann, 2008). Estudios previos, muestran que la neurotransmisión del glutamato y la dopamina está alterada en Huntington. El mecanismo por el cual la dopamina modula la excitación neuronal inducida por glutamato en los ganglios basales y el cortex podría estar dañado (Andre et al., 2010). Los estabilizadores dopaminérgicos constituyen un prometedor tratamiento para tratar la esquizofrenia y otras enfermedades donde están involucrados los circuitos dopaminérgicos en el cerebro. Estos compuestos actúan normalizando la señal dopaminérgica dependiendo del estado dopaminérgico. En los casos donde la dopamina está elevada, estos fármacos provocan la inhibición dopaminérgica, y cuando la dopamina tiene niveles muy bajos, los estabilizadores provocan una potenciación de la señal dopaminérgica (Rung et al., 2008).

En la EH, los niveles de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 están alterados, se produce una disminución en los niveles de ambos receptores en el caudado y putamen de cerebros afectados *postmortem* y también se ha confirmado por PET en individuos vivos (Richfield et al., 1991; Sedvall et al., 1994). Un tipo de estabilizador dopaminérgico que es agonista parcial del receptor D2 es el aripiprazol. Este fármaco actúa con un grado de

actividad menor que los agonistas endógenos y tiene una actividad intrínseca muy baja. Se utiliza con éxito en el tratamiento de psicosis y manías (Tadori et al., 2005). Otro tipo de estabilizadores dopaminérgicos que actúan como antagonistas puros del receptor D2 son las pridopidinas. La pridopidina es efectiva en animales que presentan signos relevantes en la enfermedad de Huntington como la depresión, ansiedad y la disfunción motora, aunque no tiene efectos sobre la corea (Lundin et al., 2010). Los compuestos (-)-OSU6162 y ACR16 (Ponten et al., 2010; Sonesson et al., 1994) pertenecen a este grupo de pridopidinas y actúan como antagonistas puros del receptor D2 con preferencia por los autorreceptores presinápticos y baja afinidad con los receptores postsinápticos. El (-)-OSU6162 ha sido utilizado en pacientes con Parkinson ya que inhibe las disquinesias provocadas por la L-DOPA, sin interferir con el tratamiento de L-DOPA (Ekesbo et al., 1997). En estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, hemos comprobado que este compuesto protege a las células estriatales STHdH^{Q7/Q7} y STHdH^{Q111/Q111} del daño provocado por agente oxidantes y tóxicos mitocondriales (Ruiz et al., 2012). El fármaco ACR16 se ha utilizado con éxito en pacientes con Huntington en un ensayo clínico doble ciego en fase 3 (de Yebenes et al., 2011).

5.4. Papel de la glía en la enfermedad de Huntington. El Medio condicionado de glía como neuroprotector

En el cerebro el 90% de las células son células de glía y desempeñan, principalmente, la función de soporte y nutrición de las neuronas. Al ser células menos diferenciadas que las neuronas, conservan la capacidad mitótica y son las que se encargan de la reparación y regeneración de las lesiones del sistema nervioso. Mantienen las condiciones homeostáticas (oxígeno y nutrientes) y regulan las funciones metabólicas del tejido nervioso, además de proteger físicamente las neuronas del resto de tejidos y de posibles elementos patógenos, al conformar la barrera hemato-encefálica (Gómez Incola et al., 2008).

Existen numerosos estudios que demuestran el papel de la glía en la enfermedad de Huntington, al expresarse la huntingtina mutada en las células de glía de ratón y de *Drosophila* (Besson et al., 2010; Bradford et al., 2009). Estudios *in vitro* demuestran que las células de glía, en condiciones determinadas, liberan al medio numerosas sustancias neuroprotectoras como antioxidantes y factores neurotróficos y a este medio rico en estas sustancias se le denomina medio condicionado de glía (MCG) (de Bernardo et al., 2003; Mena et al., 1997; Mena et al., 2002). Este MCG es rico en antioxidantes como el glutathione (GSH) y el ácido ascórbico; y posee factores de crecimiento peptídicos como el GDNF

(glia derived neurotrophic factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) junto con otras proteínas neurotróficas (Mena et al., 1994; Mena et al., 2002; Solano et al., 2008).

En este trabajo, hemos realizado experimentos para comprobar el papel neuroprotector del MCG en células Q111 mutantes para huntingtina. Hemos observado que tiene un efecto protector y regenerador frente a la toxicidad inducida por agua oxigenada y por el ácido 3-NP, siendo su efecto más potente que el observado con diferentes factores neurotróficos.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. Determinar si la supresión parcial de la proteína parkina, E3 ubiquitin ligasa, en ratones R6/1, modifica la patología característica de este modelo de enfermedad de Huntington, lo que implicaría un papel del procesamiento proteico en la patogénesis de la enfermedad.
2. Comprobar la eficacia del aceite de oliva virgen extra, potente antioxidante natural, en ratones R6/1 sintomáticos y en ratones WT y R6/1 asintomáticos.
3. Estudiar el efecto del estabilizador dopaminérgico (-)-OSU6162 en cultivos de células estriatales STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}, modelo celular de la enfermedad de Huntington. Comprobar si tiene un efecto neuroprotector frente al daño inducido por glutamato y sobre el daño oxidativo y mitocondrial.
4. Probar el efecto neuroprotector del medio condicionado de glía, medio secretado por células de glía en cultivo, tanto fetal como postnatal, sobre la toxicidad inducida por glutamato, H₂O₂ y ácido 3-nitropropiónico en células mutadas STHdh^{Q111/Q111}. Estudiar el efecto de factores de crecimiento como el GDNF, BDNF y bFGF frente al daño oxidativo y comparar su efecto protector con el del medio condicionado de glía.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y REACTIVOS

Anticuerpos:

	Casa comercial	Dilución
Anticuerpo anti- β -actina, monoclonal de ratón	SIGMA	1:5000
Anticuerpo anti- β -tubulina, policlonal de conejo	COVANCE	1:500
Anticuerpo anti-Bax, policlonal de conejo	SANTACRUZ	1:500
Anticuerpo anti-Bcl-2, monoclonal de ratón	SANTACRUZ	1:500
Anticuerpo anti-Citocromo C, monoclonal de ratón	BD biosciences	1:800
Anticuerpo anti-CHIP, policlonal de ratón	ABCAM	1:1000
Anticuerpo anti-DARPP-32, policlonal de conejo	CHEMICON	1:1000
Anticuerpo anti-ERK, monoclonal de ratón	SIGMA	1:10000
Anticuerpo anti-HSP-70, monoclonal de ratón	SANTACRUZ	1:1000
Anticuerpo anti-huntingtina, monoclonal de ratón	CHEMICON	1:500
Anticuerpo anti-LC-3, policlonal de conejo	MBL	1:1000
Anticuerpo anti-p-ERK, policlonal de ratón	SIGMA	1:4000
Anticuerpo anti-PARP, policlonal de conejo	CELL SIGNALLING	1:1000
Anticuerpo anti-ubiquitina, policlonal de conejo	CHEMICON	1:1000
Anticuerpo anti-sinaptofisina, monoclonal de conejo	CHEMICON	1:300
Anticuerpo anti-TH, policlonal de conejo	CHEMICON	WB 1:5000 IHQ 1:1000
Anticuerpo IgG Alexa Fluor de ratón	MOLECULAR PROBES	1:500
Anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón conjugado con HRP	AMERSHAM	1:1500
Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina	SIGMA	1:5000

Reactivos para Western blot:

Acrilamina/Bisacrilamida	BIORAD
Albúmina de suero bovina (BSA)	SIGMA
Azul de bromofenol	SIGMA
Azida sódica	SIGMA
β -mercaptoetanol	MERK
Glicerol	SIGMA
Glicina	SIGMA
Leche en polvo desnatada	Central Lechera Asturiana
Membranas de nitrocelulosa	AMERSHAM
Metanol	MERK
NaCl	MERK
Persulfato amónico (PSA)	SIGMA
Rojo Ponceau	MERK
SDS	MERK
TEMED	SIGMA
Trizma Base	SIGMA
Tween-20	BIORAD

Reactivos para biología molecular:

Agarosa	SIGMA
Bromuro de etidio	MERK
Isopropanol	MERK
Proteinasa K	ROCHE
SyBR Green	BIO-RAD
Taq polimerasa	BIOTOOLS

Reactivos para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica:

Acido acético glacial	PANREAC
Acido periódico	MERK
Cloruro de yodo	MERK
Diaminobenzidina (DAB)	DAKO
Etanol absoluto	MERK
Eosina	MERK
Glutaraldehído	MERK
Hematoxilina de Carazzi	MERK
Hoechst 33342 (bisbenzimidida)	SIGMA
Kit Estreptavidina-ABC	DAKO
Kit TUNEL	PROMEGA
Paraformaldehído	MERK
Rojo nuclear	MERK
Rojo Congo	MERK
Tiosulfato sódico	MERK
Tritón X-100	SIGMA
Violeta de cresilo	MERK
Yoduro de plata	MERK

Cultivos celulares:

Medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/l de glucosa	SIGMA
Medio de cultivo F12 de Ham	BIOWHITAKER
Glutamina	INVITROGEN
Piruvato sódico	INVITROGEN
Penicilina-estreptomicina con fungizona	INVITROGEN

Geneticina G480	SIGMA
Medio de cultivo L-15 de Leibovitz	BIOWHITAKER
Medio de cultivo Hank's Balances SALT Solution (HBSS)	INVITROGEN
Medio de cultivo EMEM	BIOWHITAKER
D-glucosa 45%	SIGMA
Putrescina	SIGMA
Progesterona	SIGMA
Insulina	SIGMA
Selenito sódico	SIGMA
Transferrina humana	ROCHE
Suero fetal bovino	INVITROGEN
Dimetil sulfóxido (DMSO)	SIGMA
Tripsina-EDTA 1x	INVITROGEN
Trypan blue (0.4%)	SIGMA
Placas multipocillos	COSTAR
Frascos de cultivo	NUNC

Reactivos para tratamientos de cultivos celulares:

(-)-OSU6162	Neurosearch, Suecia
Peroxido de hidrógeno	SIGMA
Rotenona	SIGMA
Acido 3-nitropropiónico	SIGMA
Glutamato sódico	SIGMA
BDNF	SIGMA
GDNF	SIGMA
bFGF	SIGMA

Otros reactivos:

Pargilina	SIGMA
Acido ascórbico	MERK
Mazindol	SANDOZ
[³ H]-DA (70 Ci/mmol)	AMERSHAM
Sulfanilamida	SIGMA
Acido nitrobenzoico	SIGMA
Glutation reducido	SIGMA
Glutation reductasa	ROCHE
Glutation peroxidasa	SIGMA
2-vinilpiridina	SIGMA
NADPH	ROCHE
Lactato deshidrogenasa	ROCHE
Kit MTT	ROCHE
Acido aminooxiacético	SIGMA
[³ H]-GABA (90 Ci/mmol)	AMERSHAM

MÉTODOS

1. ANIMALES UTILIZADOS

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones transgénicos mutantes para huntingtina (R6/1), dobles mutantes para huntingtina y deficientes en una copia de parkina (R6/1/PK^{+/-}) y ratones controles (WT) comerciales B6CBA/Ola (Harlan Laboratorios Models S.L. Barcelona, Spain), para la obtención de un mismo fondo genético para cada uno de los experimentos, como se describirá a continuación. Los animales fueron mantenidos en números similares en los distintos grupos de trabajo y en condiciones adecuadas para minimizar el estrés. Se mantiene a los ratones a temperatura y humedad controlada, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas estipulados en el estabulario. Toda la manipulación de los animales se hizo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea. Nos esforzamos en usar el menor número de animales posible y en minimizar su sufrimiento.

1.1. Reproducción, desarrollo y comportamiento de los ratones transgénicos:

La cría de los animales se realizó conforme al siguiente esquema. Los números entre paréntesis representan las frecuencias esperadas/encontradas de los genotipos expresados en % de crías.

1.2. Ratones mutantes para huntingtina R6/1.

Para realizar los experimentos con ratones R6/1 se realizaron los cruces de la siguiente manera:

♂ R6/1 x ♀ WT (B6CBAF1/J)

↓

F1: R6/1 (50/43 %), WT (50/57 %)

1.3. Ratones dobles transgénicos para huntingtina y parkina.

Para los experimentos con los ratones transgénicos heterocigotos para huntingtina y parkina (R6/1/PK^{+/-}), utilizamos unos ratones R6/1 con el mismo fondo genético que la colonia existente en el laboratorio de ratones nulos para parkina (PK^{-/-}) y realizamos los siguientes cruces:

♂ R6/1 x ♀ WT (C57BL6/129SV)



F1: R6/1 (50/43%), WT (50/57%) Con el fondo genético de la colonia PK^{-/-}

Ahora para obtener los ratones dobles transgénicos heterocigotos para huntingtina y parkina:

♀ PK^{-/-} x ♂ R6/1 (background C57BL6/129SV)



F1: R6/1 /PK^{+/-} (50/58.1 %), PK^{+/-} (50/41.9 %)

Los ratones macho R6/1 originales (Mangiarini, et al., 1996) fundadores de la colonia, fueron cedidos generosamente por el profesor J.J. Lucas (Centro de Biología molecular, Universidad Autónoma de Madrid). Los ratones R6/1 expresan el exón 1 del gen humano de la huntingtina con 115 repeticiones CAG. Los ratones originales nulos para parkina (PK^{-/-}) fundadores de la colonia, fueron cedidos por Aventis Pharma SA laboratory (Vitry-sur-Seine, France) (Itier et al., 2003). El mantenimiento de la colonia se realizó como indica el esquema superior. Los procedimientos utilizados con animales de laboratorio han sido realizados de acuerdo con la directiva de la Unión Europea.

Para realizar los experimentos con los dobles transgénicos que poseen la supresión parcial de parkina, los animales se randomizaron en cuatro grupos experimentales con seis animales de cada genotipo; WT, R6/1, PK^{+/-} y cinco animales del genotipo R6/1/PK^{+/-}. Los animales se sacrificaron a los siete meses de edad mediante dislocación cervical.

Por último, para los experimentos con aceite de oliva durante dos meses, los animales R6/1 fueron randomizados en dos grupos experimentales (R6/1⁺ con aceite y R6/1 sin aceite) con seis animales en cada grupo. Para los ensayos con aceite de oliva durante 5 meses, se utilizaron ratones WT y R6/1 con y sin aceite obteniendo cuatro grupos experimentales con seis animales de cada genotipo.

2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

El genotipo de cada ratón se confirmó mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y cada ratón se controló a lo largo del experimento mediante microchip intradérmico. El ADN genómico fue extraído a partir de un trozo de la cola del ratón de aproximadamente un centímetro y se digirió con proteinasa K (16 h a 55 °C) en buffer de lisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante (High Pure PCR template preparation kit, Roche, Barcelona, España). A continuación se aisló el ADN mediante un kit de aislamiento de ácidos nucleicos para PCR (Roche, España) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 12.000 rpm y se recogió el sobrenadante. La concentración de ADN se midió utilizando un Nanodrop® Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).

2.1. Genotipado de ratones WT y PK^{-/-}

150 ng de ADN genómico se desnaturalizó a 94 °C durante 3 min sujeto a 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 1 min a 72 °C, seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C. La PCR se realizó en un volumen final de 40 µl conteniendo 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Promega, 5 U/µl), 1 mM dNTP (4 x 0.25 mM), 2.5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 1 µl de primers específicos sense y antisense a 50 ng/µl. Para el genotipado de ratones WT y PK^{-/-}, se usaron los siguientes primers:

pk1F: 5'-TGCTCTGGGGTTCGTC-3'

pkR: 5'-TCCACTGGCAGAGTAAATGT-3' para WT y

pk2F: 5'-TTGTTT*TGCCAAGT*CTAAT-3' y pkR para ratones PK^{-/-}

2.2. Genotipado de ratones R6/1

150ng de ADN genómico fueron desnaturalizados a 94 °C durante 3 min sujeto a 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C. La PCR se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 0.75 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madrid, Spain; 5U/µL), 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 µL de DMSO y 1.5 µL de primers específicos sense y antisense a 10 µM.

Los primers específicos fueron:

HD-1D: 5'-CCGCTCAGGT*CTGCTGCTTTTA-3'

HD-1R: 5'TGGAAGGACT*TGAGGGACTC-3'.

Veinte microlitros del producto de la reacción de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% que fue posteriormente teñido con bromuro de etidio para la visualización de las bandas de ADN. El marcador de peso molecular del ADN (Roche, España) se utilizó para proporcionar el tamaño de referencia del ADN. Los tamaños de los productos de la PCR que permitieron la identificación de los diferentes genotipos fueron los siguientes: 170 bp para huntingtina mutada, 297 bp para WT y 285 bp para la parkina deletada, respectivamente.

3. ESTUDIOS DE CONDUCTA

3.1. Actividad motora

Se cuantificó la actividad motora de los animales durante 10 minutos (tras 10 minutos de adaptación). Para ello se utilizó un monitor de actividad motora (Actitrack LE 8811 V. 20/01/04, Panlab S.L.) consistente en un campo abierto (22.5 X 22.5 cm), con dos marcos provistos de 16 bandas de infrarrojos en cada eje en forma de rejilla, de forma que se puede determinar la actividad motora analizando la posición y la frecuencia con la que los ratones cortan las células infrarrojas. Cada barrera tiene un emisor y un receptor de infrarrojos, y su información se transmite a un ordenador, pudiendo así analizar distintos parámetros de comportamiento como: distancia total recorrida; velocidad media; tiempo que están moviéndose lentamente (velocidad < 5 cm/s); tiempo de inactividad; actividad exploratoria vertical (rearings), y la distribución zonal del movimiento dentro del campo abierto, para valorar la ansiedad.

3.2. Laberinto en Y

Para el estudio del aprendizaje se usó un laberinto de PVC blanco en forma de Y. Cada brazo tiene 40 cm de largo, 4 cm de ancho y 21 cm de alto, para poder asegurar un comportamiento no inducido del ratón, el suelo se sustituye para cada ratón con papel de filtro, y la parte baja del laberinto se limpia con alcohol para evitar olores entre los animales. Se analizaron las pruebas realizadas por los ratones tras un período de adaptación. Se coloca al ratón en uno de los extremos del laberinto, y se cuantifica cada una de las exploraciones en los brazos durante 5 minutos. Se considera exploración cuando el ratón sobrepasa el vértice de unión de los brazos con la parte posterior del cuerpo, sin contar la cola. Estas pruebas se realizaron siempre en la misma franja horaria, por los

mismos investigadores, en el mismo lugar y alternando los grupos de análisis con intención de minimizar los errores experimentales.

Se analizaron dos variables: % alternancia entre brazos (como un índice de memoria de trabajo) y el número de exploraciones totales.

3.3. Rota-rod

La coordinación motora se determinó utilizando un Rota-rod (LE 8200, Panlab S.L) (figura 5). El Rota-rod consiste en un tambor con un eje central estriado (para que el animal pueda sujetarse) de 25 mm de diámetro, y dividido en secciones (una por animal). Este tambor rota a una velocidad constante o acelerada, y el tiempo que el ratón es capaz de permanecer sobre el tambor es el índice de su coordinación motora. Cuando el ratón cae, activa una palanca que tiene un detector conectado a un ordenador que registra el tiempo que tarda cada ratón en caerse.

En nuestros experimentos, se acostumbró a los animales a permanecer en el tambor parados a la mínima velocidad (4 r.p.m), y después se les sometió a 3 protocolos de aceleración constante de 4 a 40 r.p.m., registrando la aceleración y tiempo en el que caían los animales cada vez, calculando la media para cada ratón.

3.4. Estudio de la zancada

La disminución de la longitud de la zancada es uno de los síntomas típicos de la enfermedad de Parkinson, por eso se diseñó un método sencillo para medirla en nuestro modelo de ratones (figura 5). Consta de un corredor iluminado de 7 cm de ancho por 60 cm de largo, que termina en una caja oscura, todo ello colocado sobre un papel de filtro intercambiable. Se tiñeron las patas del ratón con tinta para tatuaje y se colocó al ratón en el extremo iluminado. Éste tiende a ir hacia la cámara oscura, dejando sus huellas tintadas en el papel, pudiendo así medirse, posteriormente, la longitud de la zancada de cada ratón con una regla milimetrada.

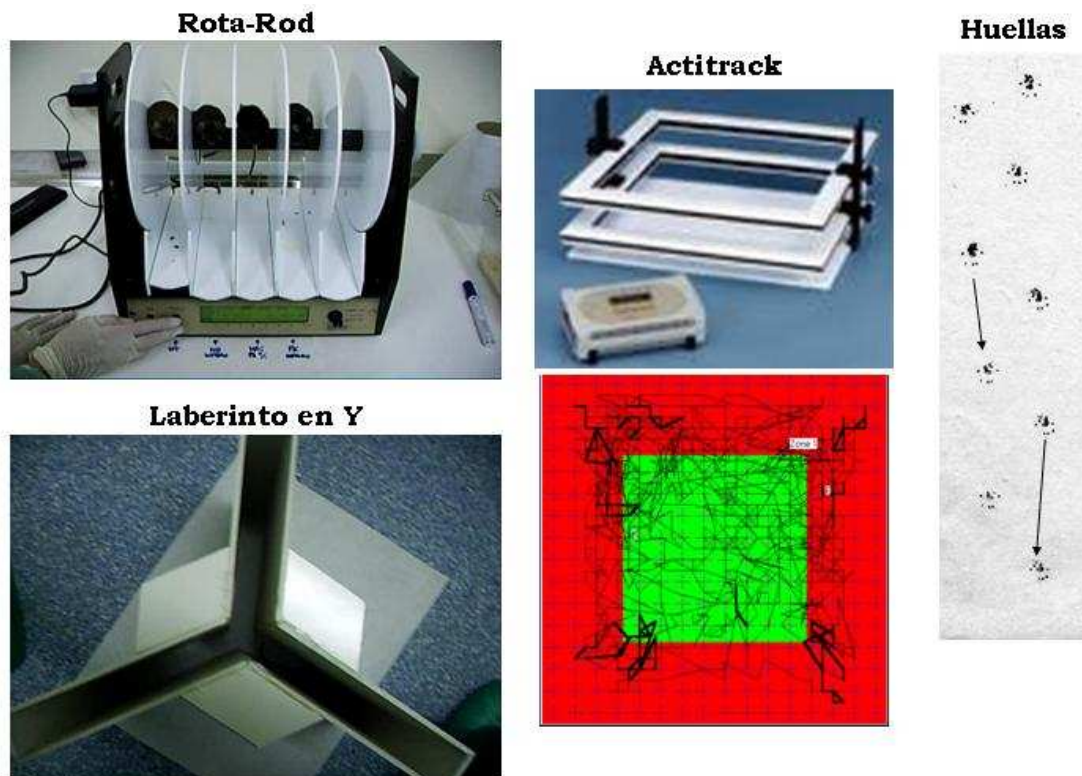


Figura 5. Aparatos utilizados para medir el comportamiento de los ratones. El Rota-rod para observar la capacidad motora; laberinto en Y como prueba de memoria en trabajo; actitrack para medir distancia total recorrida en campo abierto; y las huellas para medir la longitud de la zancada.

4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

4.1. Obtención de las muestras de tejido cerebral

Los animales para el estudio se sacrificaron mediante distensión cervical y el cerebro se extrajo sobre una placa petri con hielo y posteriormente se separaron los hemisferios mediante un corte longitudinal. El hemisferio izquierdo fue congelado en hielo seco y conservado a -80°C para análisis bioquímicos (western blot, determinación de glutatión, determinación de proteínas); el derecho fue sumergido en PFA 4% durante 2-3 días y posteriormente incluido en parafina para los análisis histológicos.

En otro grupo de animales, después de la decapitación, se diseccionó el cerebro en diferentes regiones para los estudios bioquímicos, de acuerdo con Carlsson y Lindqvist (Carlsson et al., 1973) y las áreas ricas en dopamina, el estriado y sistema límbico o el cerebro medio (midbrain), fueron usados en estos análisis. Las regiones cerebrales se congelaron en hielo seco. El cerebro entero, hemisferios o los estriados se sonicaron (Vibracell, nivel 2 cada 30 segundos) en siete volúmenes (p/v) de ácido perclórico al 0.4 N

con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.5 mM y EDTA al 2%, después se centrifugaron las muestras a 13.400g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para medir las monoaminas y sus metabolitos, así como para la determinación de glutation. El pellet, con las proteínas, fue neutralizado ($p/v=1/9$) con buffer de lisis (0.75% Na_2CO_3 , 2% SDS, 0.25 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptina, 2 mg/ml aprotinina, 10 mg/ml pepsina) y fue sonificado y centrifugado a 13400g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se usó para determinar la concentración de proteínas mediante ensayo de BCA (ácido bicinonínico) y para el análisis de distintas proteínas por electroforesis e inmunodetección.

4.2. Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica se usaron anticuerpos de Chemicon (Madrid, España) contra la tirosina hidroxilasa (TH, dilución 1:1000), huntingtina (Htt, dilución 1:500), contra un marcador específico de células mediales espinosas como es la fosfoproteína DARPP-32 (dilución 1:1000). Los anticuerpos secundarios anti-rabbit y anti-mouse fueron de Dako (Glostrup, Dinamarca). Como contraste se usó la tinción haematoxilina de Carazzi en las tinciones inmunohistoquímicas en las que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP) y reveladas con diaminobenzidina (DAB).

El número de neuronas inmureactivas para TH en sustancia negra y las neuronas inmunoreactivas para huntingtina en el estriado e hipocampo, fueron contadas en un microscopio estereológico Olympus Bx51 (Olympus, Ballerup, Dinamarca) usando el software Cast Grid. Las células marcadas con TH y los agregados de huntingtina se cuantificaron en 8-9 secciones previamente establecidas en cada cerebro de ratón, cubriendo así la superficie completa de la región antero-posterior de la sustancia negra e hipocampo respectivamente. El conteo de las células fue realizado independientemente por dos observadores “ciegos”.

4.3. Ensayo de TUNEL

El sistema de detección TUNEL se utiliza para medir apoptosis en DNA fragmentado mediante la incorporación de las células de 12-dUTP*-fluoresceína a los extremos 3'-OH del ADN mediante la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferasa). Para este experimento, las secciones cerebrales de las regiones de hipocampo y estriado fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizados con 0.2% de Triton X-100. El ADN unido al 12-dUTP de las células apoptóticas fue visualizado mediante microscopía de fluorescencia (células TUNEL positivas con fluorescencia verde). El número de células TUNEL positivas fue contado en estriado e hipocampo. Las células

fueron contadas en bandas paralelas predefinidas por las medias del conteo en retícula del ocular del microscopio (se contaron todas las células TUNEL⁺ de todo el corte). Las secciones cerebrales incubadas con buffer en ausencia de la enzima TdT se usaron como control negativo.

4.4. Determinación de monoaminas y sus metabolitos en estriado

La región del estriado fue congelada en hielo seco y los niveles de dopamina y sus metabolitos, 3-metoxi-tiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), fueron medidos por HPLC con detector electroquímico coulochem ESA. El tejido fue sonificado en 8 volúmenes (p/v) de ácido perclórico 0.4 N (PCA) con Na₂S₂O₅ 5mM y 2% EDTA y se centrifugó durante 10 min. Los niveles de monoaminas se determinaron en 20 µl del sobrenadante resultante.

Las condiciones cromatográficas fueron: columna 5C18 Nucleosil; la fase móvil fue buffer citrato/acetato 0.1 M, pH 3.9 con 10 % de metanol, 1mM de EDTA y ácido heptánico sulfónico 1.2 mM; y las condiciones de voltaje de los distintos detectores fue: D1 (célula pre-analítica) (+0.05), D2 (célula analítica) (-0.39) y la célula guardia (+0.40) (Mena, et al., 1994).

4.5. Determinación de glutatión en tejido

Los niveles de glutatión fueron medidos mediante el método de Tietze (Tietze, 1969). Una muestra de 40 µl del sobrenadante del homogenado de cerebro en PCA 0.4 N, se neutralizó con 4 volúmenes de buffer fosfato (0.2 M NaH₂PO₄, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.5 M EDTA, pH 7.5). Cincuenta microlitros de la preparación resultante, diluida 1/10 en el tampón fosfato, se mezclaron con DTNB (5,5' ditiobis (ácido nitrobenzoico)) (0.6mM), NADPH (0.2 mM) y glutatión reductasa (1 unidad), y la reacción se realizó en una placa de 96 pocillos (p96) y se analizó en un lector microtiter automático a 412 nm durante 6 min.

4.6. Inmunodetección de proteínas a partir de tejido cerebral

Los extractos proteicos (20-30 µg) fueron tratados con buffer de carga 2X (10% glycerol, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 50 mM Tris, pH 6.8 y 5% β-mercaptoetanol), separados en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa 0.45 µm. Para la inmunodetección, las membranas se bloquearon en solución PTBS (PBS 1X, 0.1% Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del bloqueo de las uniones no específicas, las membranas

se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo específico en solución de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con PTBS (PBS 1X, 0.1% Tween 20) durante 5 min cada lavado. Las membranas se revelaron usando el kit comercial (ECL-Amershan Biosciences) y las proteínas se cuantificaron mediante video densitometría acoplada a ordenador.

La proteína β -actina se usó como control de carga. El anticuerpo policlonal de conejo anti-DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP), se diluyó 1:1000, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-tirosina hidroxilasa (TH) se diluyó 1:5000, el anticuerpo monoclonal anti-Neuronal nuclei (NeuN) se diluyó 1:1500 (Chemicon); el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 (1:500), el anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax (1:500) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Hsp-70 (1:1000) son de Santa Cruz (Heidelberg, Alemania); el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CHIP (1:1000) es de Abcam (Cambridge, UK); el anticuerpo policlonal de conejo anti-LC-3 (1:1000) es de MBL (Nagoya, Japón), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-citocromo C (1:800) es de BD biosciences. El anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina se diluyó 1:5000 y es de Sigma. Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de cabra anti-ratón y anti-conejo, se diluyeron 1:1500 y son de Amersham. El anticuerpo secundario para la β -actina es un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con fosfatasa alcalina y se diluyó 1:5000 (Sigma).

5. ESTUDIOS *IN VITRO*

5.1. Cultivos neuronales y de células de glía

El modelo celular STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} utilizado en algunos experimentos fue cedido amablemente por el Prof. Jordi Alberch (Universidad Autónoma de Barcelona). Estas células son progenitoras estriatales que provienen de ratones knock-in para huntingtina y expresan esta proteína normal o mutada a niveles endógenos. Las células estriatales wild-type (STHdh^{Q7/Q7}) contienen huntingtina normal con 7 repeticiones de glutamina, y las células estriatales mutadas (STHdh^{Q111/Q111}) contienen huntingtina mutada con 111 repeticiones de glutamina. Estas células fueron descritas previamente (Trettel, et al., 2000). Los cultivos de neuronas estriatales, fueron mantenidos en el incubador a 33°C en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1 % estreptomycin-penicilina, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato sódico y 400 µg/ml de geneticina (G-418). Veinticuatro horas antes de realizar los

tratamientos, el medio de cultivo se cambió por un medio definido carente de suero (EF12) que consiste en 1:1 (v/v) EMEM y mezcla de nutrientes de Ham's F12, suplementado con D-glucosa (6 mg/ml), insulina (25 µg/ml), transferrina (100 µg/ml), putrescina (60 µM), progesterona (20 nM), y selenito sódico (30 nM).

Los cultivos de glía estriatales para la obtención de medio condicionado de glía, se obtuvieron a partir del estriado de ratones WT (129SV/C57BL/6). El estriado fue extraído de tejido embrionario de ratones E16 (16 días de gestación) y de ratones post-natales de 13 días y 2 meses de edad. El tejido se diseccionó en pequeños fragmentos, y se incubó en tripsina-EDTA (0.5% en HBSS) a 37°C durante 15 minutos. La tripsinización se paró añadiendo medio de cultivo y el tejido fue centrifugado. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo. La disociación de las células se realizó mediante ruptura química y mecánica.

Los cultivos de glía estriatales enriquecidos en astrogliá se obtuvieron a partir de células mantenidas en cultivo desde 10-15 días hasta 3 meses en DMEM-FCS (suero fetal bovino). Semanalmente se les cambió el medio sustituyéndolo por medio fresco. El marcaje positivo con un anticuerpo específico de la proteína ácida gliofibrilar (GFAP⁺) que marca positivamente las células astrogliales, demostró que pasados 15-20 días en cultivo, el 80-90% del total de células eran astrocitos (Mena et al., 1997).

Para obtener el *medio condicionado de glía* (MCG), el medio completo fue descartado se lavaron las células tres veces con medio Leibovitz's L-15, para retirar el resto de suero y a continuación se mantuvieron las células en un medio definido, carente de suero, durante 24 horas. Transcurridas estas 24 horas, ese medio se recogió y se consideró medio condicionado de glía (MCG). Este MCG después de ser centrifugado se congeló en alícuotas a -80°C hasta su uso.

5.2. Tratamiento de las células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}

Los experimentos celulares se realizaron en placas de cultivo de 12 y 24 pocillos para ensayos de Western blot y medidas de ubiquitinización y para ensayos de viabilidad y muerte celular respectivamente. Para la detección inmunocitoquímica, las células se sembraron en cubreobjetos de 13 mm de diámetro a una densidad de 5000 cels/cubre.

Tras 3 días *in vitro* (DIV) en el medio de cultivo DMEM-FCS, las células Q7 y Q111 llegan a un 80 % de confluencia. En este momento, el medio se retiró y se cambió por medio definido (EF12) carente de suero y por MCG (fetal o postnatal) en los experimentos correspondientes. A continuación se añadieron los diferentes neurotóxicos y se realizaron los experimentos a las 24 horas de incubación con éstos. Los tóxicos utilizados fueron

glutamato sódico (5 mM), peróxido de hidrógeno (2 μ M), rotenona (0.1 y 0.5 μ M) y ácido 3-nitropropiónico 3NP (2.5 mM). En los experimentos con MCG, se realizaron ensayos con diferentes factores de crecimiento para probar su neuroprotección y comparar su efecto con el MCG. Éstos fueron bFGF (10 y 20 ng/ml), BDNF (50 y 100 ng/ml), GDNF (50 y 100 ng/ml). El fármaco neuromodulador de la actividad dopaminérgica, (-)-OSU6162, (150 y 300 μ M) se añadió media hora antes que los neurotóxicos.

5.3. Inmunocitoquímica

Las células se sembraron en cubreobjetos y al tiempo del estudio, las células se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS). Después se realizaron tres lavados con PBS, y se procedió a su postfijación y permeabilización con una solución de etanol: acético glacial (19:1) durante 10 minutos a -20°C seguidos de otros tres lavados con PBS. Posteriormente se procedió al bloqueo de la tinción inespecífica con PBS más suero fetal bovino al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario de la proteína a estudiar en una mezcla de PBS y suero durante toda la noche a 4°C. Se lavaron los cubres tres veces con PBS y después se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes, Alexa Fluor verde monoclonal o alexa fluor rojo policlonal (1:500) en PBS más suero durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La mezcla de los anticuerpos secundarios se centrifugó previamente a 12.000 rpm durante 1 minuto en oscuridad y a 4°C para evitar la presencia de cristales del fluorocromo en las muestras. Posteriormente, se lavaron los cubres con PBS y por último se montaron en portaobjetos sobre una gota de solución antidecolorante non-fade (50 mg de p-fenilendiamina disuelta en PBS 0.01 M-glicerina 1:9 ajustando a pH 8 con tampón carbonato-bicarbonato 0.5 M) que contenía bisbenzimida (Hoescht 33342, que tiñe todos los núcleos al unirse al ADN) a una concentración de 3×10^{-5} M. Para valorar la fluorescencia inespecífica, se incubaron algunos cubres con el anticuerpo secundario, sin haber incubado con el anticuerpo primario.

5.4. Valoración y cuantificación del área total ocupada por neuronas (β -tubulina) y determinación del número de células diferenciadas (sinaptofisina)

Con el fin de determinar los cambios producidos con los diferentes tratamientos farmacológicos en los cultivos celulares (Q7 y Q111), se utilizó el anticuerpo β -tubulina (1:500) (Millipore). Mediante un microscopio estereológico invertido de fluorescencia

acoplado a una cámara SONY 950 C, se captaron 20 imágenes de cada cubre lo que corresponde a 1/7 del área total del cubreobjeto. Las imágenes de las células inmunofluorescentes fueron procesadas mediante un programa de análisis de imagen (Image-Proplus).

El número de imágenes que se valoró fue de 10 campos en cada cubre y de 6 cubres por cada grupo experimental.

Para la cuantificación de neuronas diferenciadas con arborizaciones, se contaron las células con más de 3 prolongaciones y se las denominó células multiproceso (MP). Esta cuantificación se realizó utilizando el anticuerpo anti-sinaptofisina (1:300) (Millipore).

5.5. Ensayos de viabilidad y muerte celular en células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}

5.5.1. Actividad mitocondrial

La actividad mitocondrial se determinó mediante el ensayo de MTT que mide la capacidad de la mitocondria para reducir 3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio.

Al final del tratamiento experimental, 300 µl del medio de cultivo de cada pocillo de la placa se retiraron y a los 200 µl restantes se les añadieron 20 µl de solución de MTT durante 3 horas a 37°C. Transcurridas esas 3 horas, se añadieron 200 µl de la solución de lisis (10 % SDS (dodecil sulfato sódico) en HCl 0.01 M) y se mantuvo la placa a 37°C durante 24 horas. 100 µl de medio se traspasaron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (SpectraFluor; Tecan, Mennedorf, Switzerland).

5.5.2. Condensación y fragmentación de la cromatina

Las células sembradas en el cubreobjetos se fijaron con PFA al 4% y los núcleos se tiñeron con bisbenzimidá (Hoescht 33342) añadiendo non-fade a la solución (Pardo et al., 1997). Se realizó un conteo de 10 campos por cubre y se consideró como célula apoptótica aquella cuya cromatina apareciese condensada o fragmentada al microscopio.

5.5.3. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Para determinar la muerte celular por necrosis, se midió la actividad lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo utilizando un kit de detección citotóxica (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

5.5.4. Ensayo de exclusión por azul de tripán y yoduro de propidio

Con el fin de determinar la muerte por necrosis, también se utilizó el ensayo de exclusión de azul de tripan (trypan blue) y el conteo de muerte con la tinción de yoduro de propidio (IP), que permite la entrada del colorante a las células cuya membrana celular está rota, expresando los datos como el porcentaje de células muertas con respecto al total de células del cultivo. Para el ensayo con azul de tripan, el medio fue retirado y se añadió azul de tripan (Sigma; 1 volumen por 2.5 volúmenes de PBS) y el número de células viables (sin teñir) y de células muertas (teñidas) se contó durante 3 minutos. Se contaron alrededor de 100 células por campo en un total de diez campos por cubre. Los experimentos se realizaron por triplicado. En el caso del IP (Sigma), las células necróticas y apoptóticas se analizaron mediante microscopía con fluorescencia usando doble tinción con Hoechst 33342. Tras lavar con medio rico en Na^+ , las células fueron incubadas con $7.5 \mu\text{g/ml}$ de Hoechst 33342 y $4 \mu\text{g/ml}$ de IP, en oscuridad, durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces en el medio rico en Na^+ para eliminar los restos extracelulares y el resultado se observó usando un microscopio Olympus 1x70. Las células IP positivas fueron contadas de la misma manera que en el ensayo de trypan blue. Las células muertas aparecen en rojo y en azul los núcleos de las células vivas.

5.6. Medidas de glutatión intracelular

Los niveles de glutatión se midieron siguiendo el método de Tietze, 1969. Para este ensayo, las células se lavaron con PBS dos veces y se lisaron con $100 \mu\text{l}$ de ácido perclórico (PCA) $0,4 \text{ N}$ a 4°C durante 30 minutos. Después se centrifugaron las células y se recogieron los sobrenadantes a los cuales se les neutralizó con 4 volúmenes de un tampón $0,1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, 5 mM EDTA , $\text{pH } 7.5$. Se recogieron $50 \mu\text{l}$ y se añadió el reactivo colorante DTNB ($0,6 \text{ mM}$), el cofactor NADPH ($0,2 \text{ mM}$) y la enzima glutatión reductasa. La Reacción enzimática se monitorizó en un lector de placas midiendo absorbancia a 412 nm durante 6 minutos. Se realizó en paralelo la curva patrón de GSH con concentraciones crecientes desde $6,25$ hasta 100 ng .

5.7. Captación de [^3H]-GABA]

La captación de [^3H]-GABA se realizó en presencia de ácido aminooxiacético 10^{-5} M , inhibidor del metabolismo de GABA, y de ácido ascórbico 10^{-3} M , como antioxidante. Se incubó durante 4 minutos con [^3H]-GABA 10 nM (90 Ci/mmol). La captación no

específica se calculó incubando los cultivos a 0°C, y esa captación inespecífica resultó siempre menor del 7% del total (Michel and Hefti, 1990).

5.8. Liberación y captación de alta afinidad para [³H]-dopamina

Tanto la captación como la liberación de [³H]-DA se realizó en cultivos neuronales primarios embrionarios (estadío E13) de mesencéfalo de ratones WT (cepa 129SV/C57B6/6) (Mena et al., 1993). Las células se sembraron en medio de cultivo B27/neurobasal TM con 15 % de suero fetal bovino a una densidad de 2×10^5 cels/cm² en multipocillos tratados con poli-D-lisina (4.5 mg/cm²) en buffer 0.1M borato, pH 8.4. Los cultivos se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5 % de CO₂ durante 6-7 días. Veinticuatro horas después de la siembra, se cambió el medio de cultivo por un medio definido sin suero.

La liberación de [³H]-DA basal o inducida por K⁺ y anfetamina se estudió después de 6-7 días de cultivo. Cada cultivo se lavó una vez con 0.5 ml de buffer Krebs–Ringer–HEPES (KRH), y después se añadió [³H]-DA y se incubó durante 20 minutos a 37 °C con KRH conteniendo [³H]-DA (5×10^{-8} M) y desipramina (5×10^{-5} M). La liberación basal de [³H]-DA se midió en los cultivos durante 5 minutos a 23 °C con 0.5 ml de KRH. La liberación inducida por K⁺ o anfetaminas se midió de manera similar, pero añadiendo KCl (50 mM) o anfetamina (10 µM). La radioactividad en el medio fue medida en un contador de centelleo en 2.5 mL de líquido de centelleo OptiPhase HiSafe 2. Al finalizar el experimento, la radiactividad residual intracelular se extrajo incubando las células durante 30 minutos con 0.2 ml de NaOH (0.4 N) y luego se contó. La liberación de [³H]-DA está expresado como el porcentaje de contenido total intracelular presente en el cultivo en el momento de la incubación, para corregir las variaciones en la cantidad de [³H]-DA captada por los diferentes cultivos.

La captación de alta afinidad de [³H]-DA, se midió después de incubar las células con [³H]-DA 10^{-8} M (70 Ci/mmol), en presencia de pargilina 10^{-5} M y de ácido ascórbico 10^{-3} M a 37 °C durante 20 minutos (Itier et al., 2003). La captación no específica se calculó en presencia del inhibidor mazindol 10^{-5} M (Mena et al., 1996). La concentración de proteína se calculó mediante el ensayo BCA. Esta técnica también se utilizó para comprobar la capacidad neurotrófica del MCG.

5.9. Electroforesis e inmunodetección de proteínas en cultivos celulares

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 60.000 células/cm² y se mantuvieron durante 3 DIV. Después de los distintos tratamientos se

retiró el medio de cultivo y se recogieron 3 pocillos de la p12 en 150 µl de tampón de lisis (Tris-HCl, 20 mM; 10 mM AcK, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, leupeptina, aprotinina, pepstatina 5 µg/ml (inhibidores de proteasas), Tritón x-100, 0.24 %; 10 mM FNa, 2 mM molibdato sódico, 10 mM β-glicerolfosfato, 0.2 mM ortovanadato (inhibidores de fosfatasas). Las células se recogieron en hielo (10 minutos) con la ayuda de un rascador, y después se sonicaron durante 60 segundos. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 12.000 rpm y a 4°C. Del sobrenadante se hicieron alícuotas y se congelaron a -80 °C. Después se determinó por el método de BCA la concentración de proteínas.

Las muestras se añadieron al tampón de carga (Tris 0.186 M, azul de bromofenol 0.25 mg/ml, β-mercaptoetanol 6 %, glicerol 15 % v/v y SDS 9 % (p/v)) y se sometieron a separación por peso molecular mediante electroforesis continua en condiciones desnaturalizantes sobre geles de poliacrilamida al 8 y 10 %, cargando 30 µg de proteína. Seguidamente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm mediante electrotransferencia. Para el inmunomarcaje, se siguieron los mismos pasos que en los western blot con muestras de tejido.

Los anticuerpos utilizados fueron: el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 (1:500), el anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax (1:500), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CHIP (1:1000), el anticuerpo policlonal p-ERK (1:4000), el anticuerpo monoclonal ERK (1:10000), el anticuerpo policlonal PARP (1:1000) (Cell Signalling Technology) y el anticuerpo monoclonal Hsp70 (1:1000). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de cabra anti-ratón y de cabra anti-conejo, se diluyeron 1:2000. El anticuerpo secundario para la β-actina es un anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, se diluyó 1:10000 y se usó como control de carga.

5.10. Detección de proteínas ubiquitinizadas

Para determinar los cambios en la ubiquitinación de las proteínas, las células fueron tratadas con H₂O₂ (2 µM) en medio definido y en MCG durante 24 horas. Después se resuspendieron en 150 µl de buffer de lisis [50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 50 mM fluoruro sódico, 20 mM N-ethyl-maleimida, 100 µM ortovanadato sódico], 1 mM PMSF y cocktail inhibidor de proteasas (SIGMA). Los lisados celulares se hirvieron durante 5 min a 95 °C y se centrifugaron a 12.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. 7.5 µg de proteína fueron utilizadas para realizar la posterior inmunodetección con el anticuerpo policlonal para ubiquitina (1:1000) de Chemicon.

5.11. Caracterización del perfil proteico del medio condicionado de glía fetal y el medio definido

El medio definido (MD) y el MCG fetal (E16) fueron liofilizados y concentrados al 5% del volumen inicial en agua. La concentración de proteína se determinó mediante el método del BCA. 5 µg de proteína procedente del sobrenadante de ambos medios, se usó para cargarlo en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE del 4 al 20% de gradiente. La electroforesis se realizó a 150 V. Después de este paso, el gel se tiñó con plata para observar el distinto perfil proteico del MCG fetal estriatal (E16) *vs* el medio definido.

5.12. Cuantificación de radicales libres

Los radicales oxidativos libres intracelulares fueron detectados utilizando un ensayo intracelular de ROS (especies reactivas de oxígeno). El compuesto no fluorescente DCF (diclorofluoresceína) es oxidado por los radicales libres para formar un DCF altamente fluorescente. Las células fueron incubadas con 5 µM de DCFH-DA (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) durante 30 minutos antes del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Después de lavar el exceso de DCF con un medio sin rojo fenol (PBS con 1mM de glucosa), la fluorescencia se midió tanto en el microscopio de fluorescencia como en un espectrofotómetro (Spectra Fluor, Tecan) con excitación de 485 nm y emisión de 535 nm.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido del test comparativo múltiple de Newman Keuls. La interacción entre el genotipo y el tratamiento o entre genotipos se analizó mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la $p < 0.05$. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Software (San Diego, CA) Prism 4 software.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

Estudios *in vivo* con ratones R6/1

1. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES R6/1 A LO LARGO DEL TIEMPO

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron una serie de déficits motores y pérdida de peso corporal en ratones R6/1 que aumentaban con el transcurso del tiempo y la aparición de síntomas de la enfermedad (Rubio, et al., 2009). Por ello, decidimos realizar un estudio histológico a diferentes edades, desde un mes de edad, momento en el cual los ratones están asintomáticos, hasta los 9 meses de edad cuando la enfermedad está muy avanzada.

1.1. Estudio histológico a diferentes edades

Para poder ver la evolución de las lesiones histológicas en este modelos de enfermedad de Huntington en ratones R6/1, escogimos hembras WT y R6/1 y las sacrificamos desde 1 mes hasta los 9 meses de edad (1, 2, 4, 7 y 9 meses). Las inclusiones de huntingtina en el estriado de ratones R6/1 van aumentando con la edad. Durante los 4 primeros meses, cuando los ratones aún no han desarrollado la sintomatología motora, estas inclusiones aumentan de manera exponencial, mientras que a partir de los 5 meses que ya presentan problemas motores, el número de inclusiones en el estriado aumenta más lentamente (figura 6 A, B).

El número de células TH⁺ en la sustancia nigra de los ratones R6/1 es un 55.6% menor que los WT ya en el primer mes de edad, manteniéndose esta relación hasta los 9 meses de edad (figura 6 C, D). Existe además interacción entre el genotipo y la edad en cuanto a la expresión de células TH⁺ en la sustancia nigra. Esto nos indica una alteración o disfunción de la ruta dopaminérgica muy importante a muy temprana edad en los ratones R6/1.

En cuanto a la proteína DARPP-32, marcador específico de las neuronas estriatales medianas espinosas, también pudimos ver un descenso en el número de células inmunorreactivas a DARPP-32 positivas ya desde el primer mes de edad en los ratones R6/1 comparado con los WT (figura 6 E, F). Este descenso progresivo fue observado hasta los 9 meses de edad.

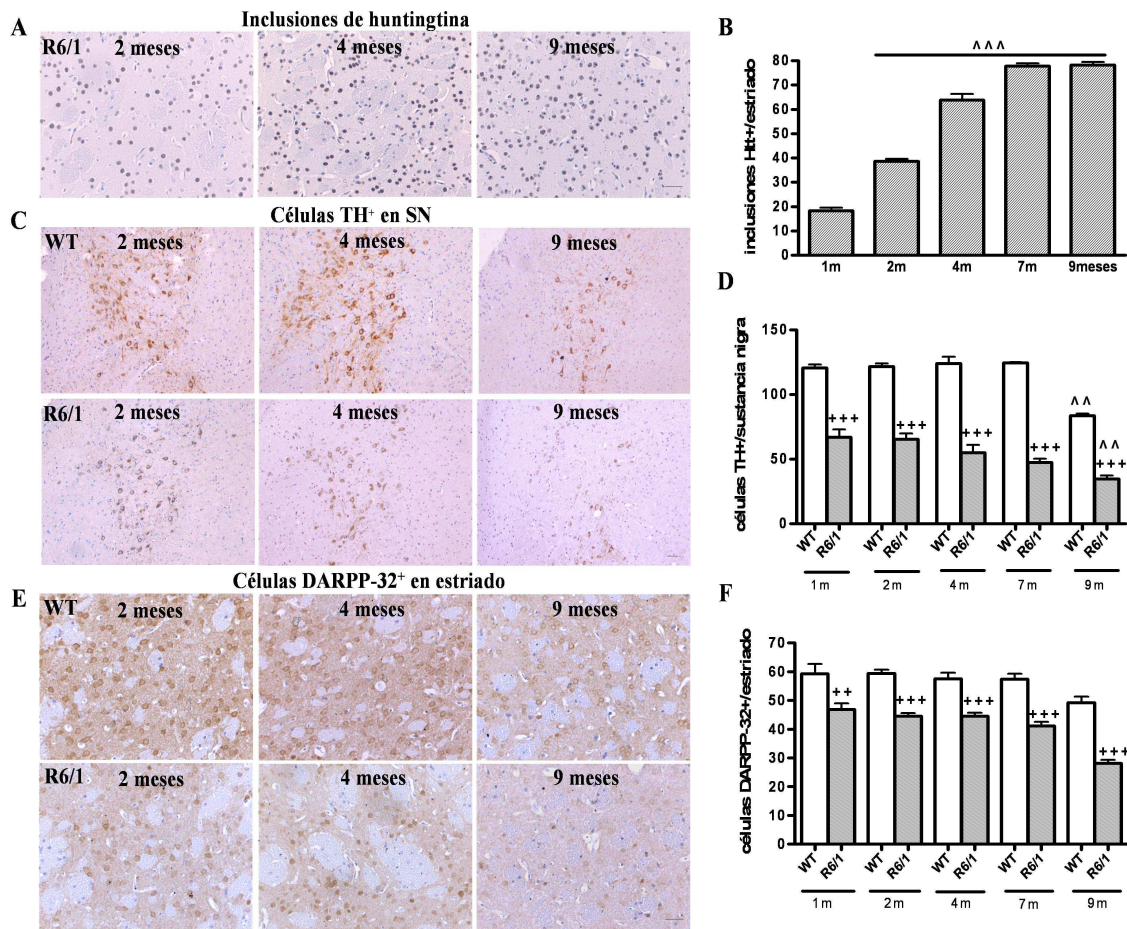


Figura 6. Caracterización del fenotipo de los ratones R6/1 a lo largo del tiempo. Estudio histológico en hembras WT y R6/1 desde 1 mes hasta 9 meses de edad. **A:** Imagen representativa de las inclusiones de huntingtina en el estriado de ratones R6/1 (escala = 30µm). **B:** Número de inclusiones de huntingtina en el estriado. **C:** Micrografía de la sustancia nigra y las células TH positivas. **D:** Histograma del número de células TH positivas por corte. **E:** Micrografía de las células DARPP-32 positivas en el estriado de los ratones WT y R6/1. **F:** Histograma del número de células DARPP-32 positivas por corte. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 4 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una y dos vías seguido del test “Newman-Keuls” y Bonferroni, respectivamente. ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ R6/1 *vs* WT; ^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ *vs* 1mes de edad. Existe interacción entre el genotipo y la edad en la expresión de TH con una $F(4,18) = 3.83$, con una p de 0.0201.

2. EFECTO DE LA SUPRESIÓN PARCIAL DE PARKINA EN RATONES R6/1

2.1. Evolución y fenotipo de los animales

Como hemos comentado con anterioridad, la degradación de la proteína huntingtina mediante el UPS en la enfermedad de Huntington parece estar alterada (Hunter et al., 2007). Por ello, decidimos estudiar si la pérdida de función de la proteína E3-ubiquitin ligasa, la parkina, tenía algún efecto beneficioso o perjudicial sobre el fenotipo de la enfermedad de Huntington en el modelo del ratón R6/1. Para trabajar en esta hipótesis, generamos el ratón doble mutante R6/1/PK^{+/-}, que carece de una copia del gen de la parkina.

Todos los grupos de animales se desarrollaron y ganaron peso de manera normal hasta los tres meses de edad. Después de este período de tiempo, y hasta el momento del sacrificio a la edad de 7 meses, los ratones R6/1 y los R6/1/PK^{+/-} comenzaron a perder peso, no así los PK^{+/-} o los WT (figura 7 A). La reducción del peso fue algo más pronunciada en los ratones R6/1 que en los ratones dobles mutantes R6/1/PK^{+/-} y las diferencias entre estos dos grupos fueron estadísticamente significativas a los 4 y 5 meses de edad.

La conducta motora de los diferentes grupos de animales fue la esperada durante los primeros tres meses de edad. A partir de esa edad, tanto los ratones R6/1 como R6/1/PK^{+/-} mostraron un deterioro progresivo a nivel motor en los diferentes tipos de tests. La actividad motora global, medida como la distancia total recorrida en el Actitrack, descendió significativamente en los dobles mutantes pero no en los demás grupos experimentales (figura 7 B). Las alteraciones en la marcha, medidas como la longitud de la zancada, se redujeron significativamente en los ratones PK^{+/-} y algo más en los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-} (figura 7 C). Nuestro grupo de investigación ha demostrado con anterioridad que la longitud de la zancada se ve reducida en los ratones viejos homocigotos nulos para parkina (PK^{-/-}) (Rodríguez-Navarro et al., 2008). Ahora demostramos que esa alteración de la zancada también aparece en ratones heterocigotos PK^{+/-}. La coordinación motora, analizada como el tiempo de permanencia de los animales sobre la rueda del Rota-Rod, se altera tanto en ratones R6/1 como R6/1/PK^{+/-} sin diferencias entre estos dos grupos (figura 7 D). La capacidad exploradora y de memoria de trabajo, medida como el número de entradas en los brazos del laberinto en Y, se ve reducida significativamente en los dobles mutantes (figura 7 E). En resumen, los dobles mutantes R6/1/PK^{+/-} tienen un

patrón de conducta motora con deterioro más grave que los ratones R6/1, pero las diferencias solo son significativas en algunos parámetros de conducta, no en todos.

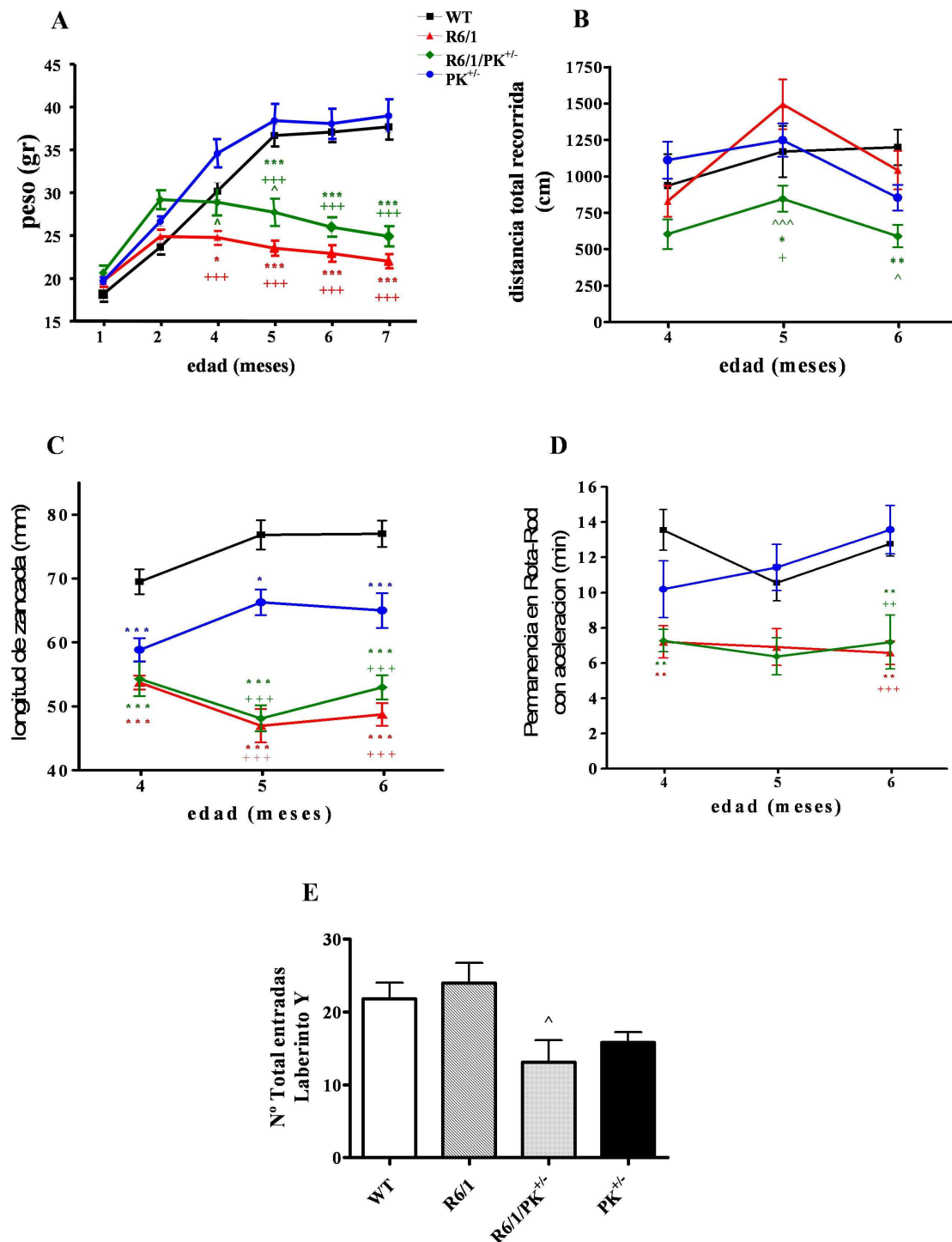


Figura 7. Peso corporal y comportamiento de ratones WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-}. **A:** Peso corporal. **B:** Actividad motora medida como la distancia total recorrida en 10 minutos en el Actitrack a los 4, 5 y 6 meses de edad. **C:** Longitud de la zancada. **D:** Tiempo de permanencia en el Rota-Rod. **E:** Actividad exploratoria expresada como el número de entradas totales en el laberinto en Y a los 6 meses. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 8$ muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una y dos vías seguido del test “Newman-Keuls” y Bonferroni, respectivamente * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs WT; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs PK^{+/-}; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.001$ vs R6/1.

Existe interacción entre el genotipo y el tiempo en el peso corporal con una $F(15,144) = 13.03$, con una $p < 0.0001$.

2.2. Ruta nigroestriatal de la dopamina y niveles estriatales de los metabolitos de las monoaminas en los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}

La patogénesis del parkinsonismo en Huntington es poco conocida. En este estudio, la revisión microscópica de las secciones cerebrales de ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}, teñidas contra tirosina hidroxilasa (TH), sugiere una desaparición importante de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en los ratones R6/1 y los dobles mutantes R6/1/PK^{+/-} (figura 8 A-H). La cuantificación del número de neuronas TH⁺ demuestra una reducción en estos dos grupos de animales de alrededor de un 50 % con respecto a estas neuronas en ratones WT y PK^{+/-} (figura 8 I). Los niveles de proteína TH, medida mediante western blot, están reducidos en el estriado de los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-} con respecto a los ratones WT y PK^{+/-} (figura 8 J).

Otros sistemas de neurotransmisión, además del dopaminérgico, están alterados en la enfermedad de Huntington, la depresión es frecuente en esta enfermedad. Por ello, hemos investigado el nivel de otras monoaminas en estos ratones. La dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5HT) y sus correspondientes metabolitos, están reducidos en el estriado de los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-} en comparación con los niveles encontrados en ratones WT y PK^{+/-} (figura 8 K-P). No hay diferencias en los niveles de estos neurotransmisores entre los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}. Como esperábamos, no hubo diferencias en las monoaminas y sus metabolitos entre los ratones WT y PK^{+/-}.

2.3. Inclusiones de huntingtina y muerte celular en las diferentes áreas cerebrales de los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}

Las inclusiones de huntingtina sólo se detectaron en el estriado de los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-} (figura 9 A-H). Contrario a nuestra hipótesis, el número de células con agregados de huntingtina se vió reducido en ratones R6/1/PK^{+/-} con respecto a ratones R6/1 (figura 9 I). El número de células DARPP-32⁺, disminuyó considerablemente tanto en ratones R6/1 como en R6/1/PK^{+/-} (figura 9 J-Q), y también se observó una pérdida severa de la proteína DARPP-32 en el estriado de los dos mutantes para huntingtina (Fig. 9 R). Sin embargo, no hubo diferencias entre los dos grupos de ratones mutantes y se observó un aumento leve pero no significativo en los ratones PK^{+/-}.

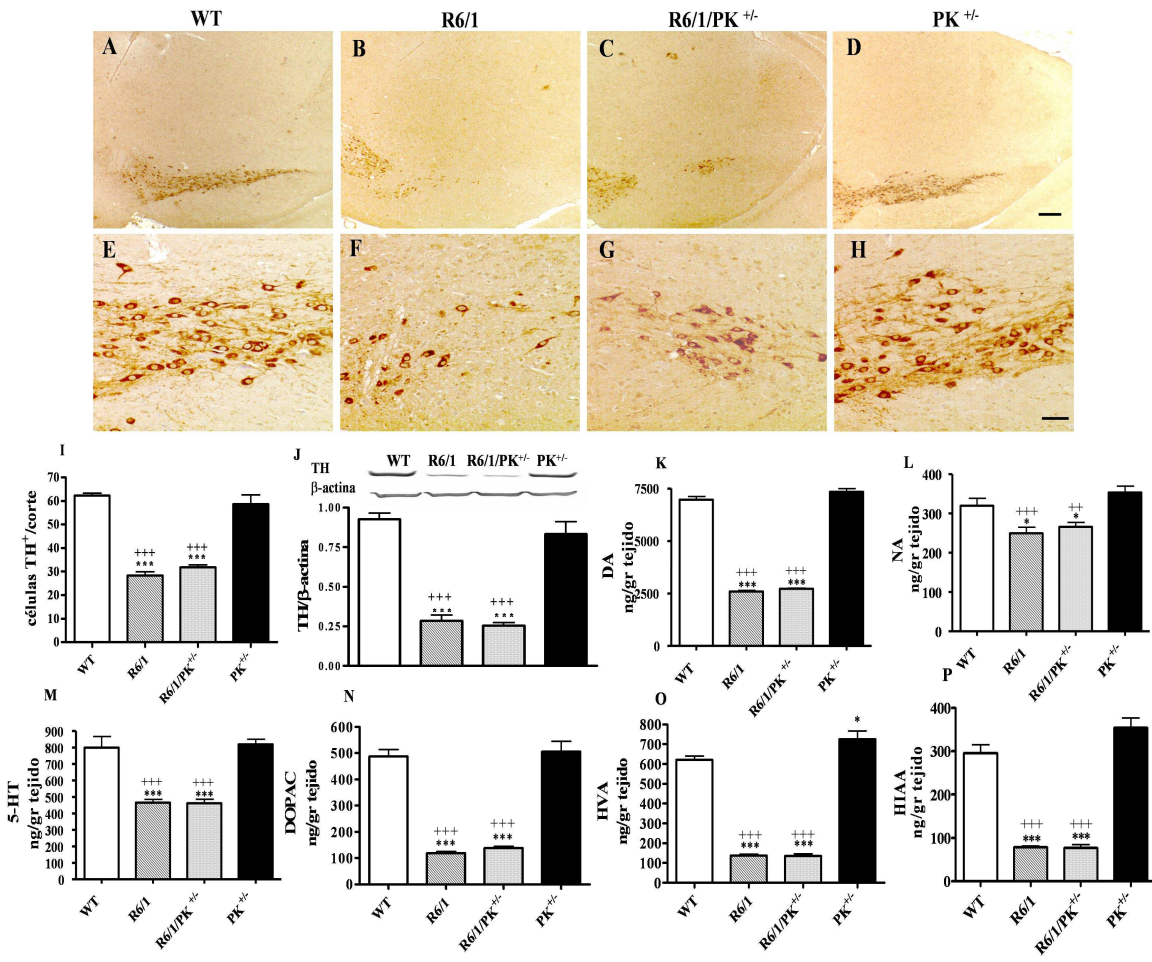


Figura 8. Ruta nigrostriatal de la dopamina, monoaminas y sus metabolitos en el estriado de ratones de 7 meses de edad WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-}. **A-H:** Micrografías representativas de células TH positivas en la sustancia nigra (escala = 50 μ m de la A-D y 30 μ m de la E-H). Tinción con anticuerpo anti-TH en cerebro medio de ratones WT (A y E), R6/1 (B y F), R6/1/PK^{+/-} (C y G) y PK^{+/-} (D y H). **I:** Número de células TH positivas por corte en sustancia nigra. **J:** Niveles de TH/ β -actina en el estriado de ratones WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-}. **K:** Niveles de dopamina, **L:** Norepinefrina, **M:** Serotonina, **N:** Acido 3,4-dihidroxi-fenil-acetico, **O:** Acido homovalínico y **P:** Acido 5-hidroxi-indol-acetico. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 6 animales en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ *vs* WT; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ *vs* PK^{+/-}. La mutación de la huntingtina es la responsable de las diferencias en el número de células TH positivas, en los niveles de TH y en los niveles de monoaminas y sus metabolitos en el estriado.

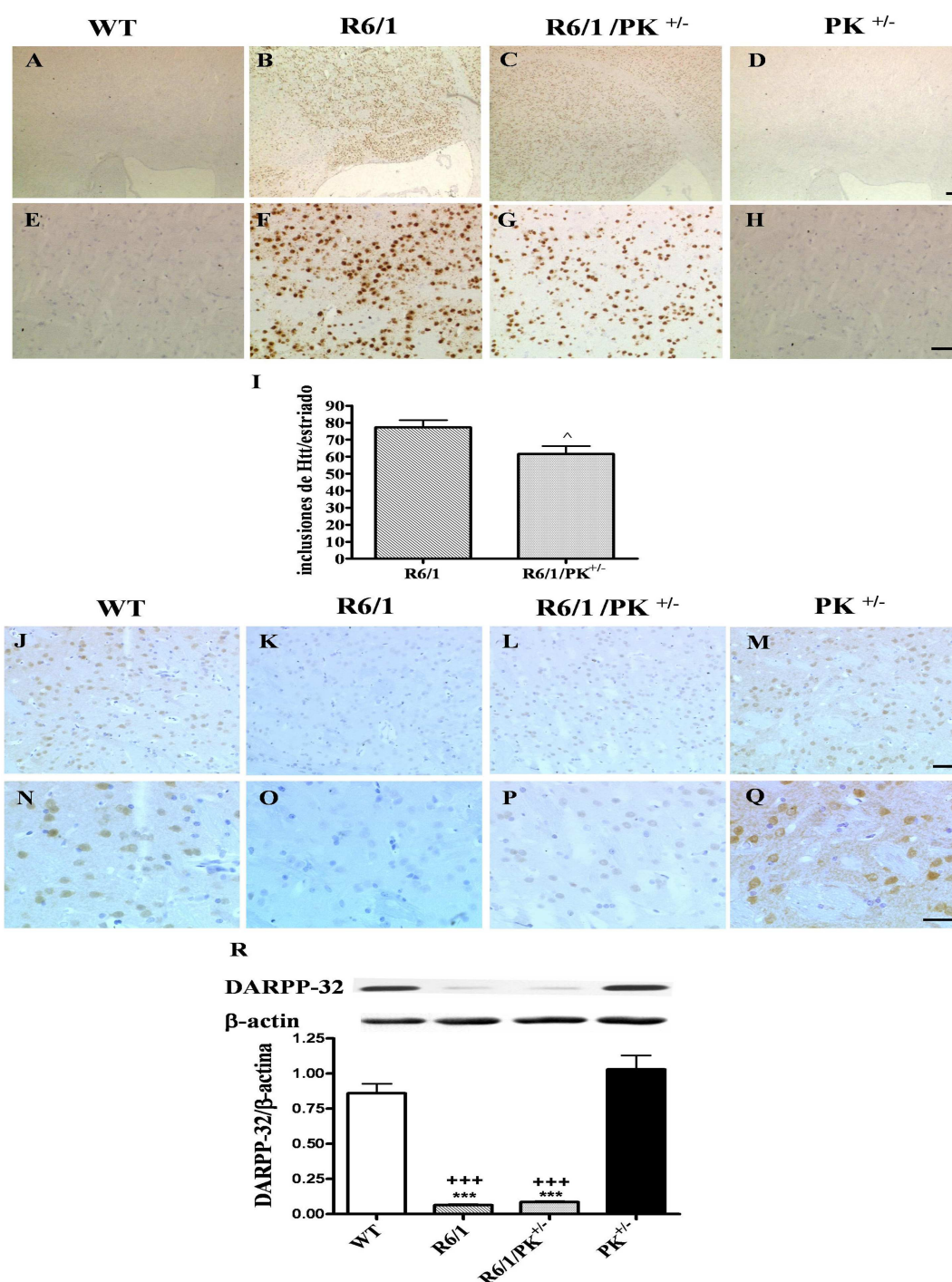


Figura 9. Inclusiones de huntingtina y células DARPP-32 positivas en estriado de ratones WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-}. **A-H:** Imágenes representativas de las inclusiones de huntingtina en estriado de ratones WT (A y E), R6/1 (B y F), R6/1/PK^{+/-} (C y G) y PK^{+/-} (D y H) (A-D, escala = 100 μ m; E-H, escala 30 μ m) **I:** Contaje del número de inclusiones de huntingtina en el estriado de ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}. **J-Q:** Imágenes representativas de células DARPP-32 positivas en el estriado de los cuatro grupos experimentales (J-M, escala = 50 μ m; N-Q, escala = 30 μ m). WT (J y N), R6/1 (K y O), R6/1/PK^{+/-} (L y P) y PK^{+/-} (M y Q). **R:** Niveles de la proteína DARPP-32/β-actina en estriado. Los valores están expresados como la media \pm

SEM ($n = 6$ animales en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. *** $p < 0.001$ *vs* WT; +++ $p < 0.001$ *vs* PK^{+/-}; ^ $p < 0.05$ *vs* R6/1.

Hemos estudiado la muerte celular mediante la técnica de TUNEL tanto en estriado como en hipocampo de todos los grupos experimentales. Las imágenes representativas del TUNEL (figura 10 A) y Hoechst (bisbenzimidá) (figura 10 B) y su colocalización en el estriado (figura 10 C) de los ratones R6/1/PK^{+/-} muestran que el número de células muertas TUNEL⁺ aumentó de forma significativa en los ratones R6/1/PK^{+/-} con respecto al control (figura 10 D). En el hipocampo ambos ratones transgénicos muestran un aumento en la muerte celular (figura 10 E). El cociente de las proteínas pro/antiapoptóticas Bax/Bcl2, reveló un aumento en los ratones R6/1/PK^{+/-} y R6/1 en el estriado (figura 10 F), lo que podría sugerir un mayor riesgo de muerte neuronal en este grupo de animales.

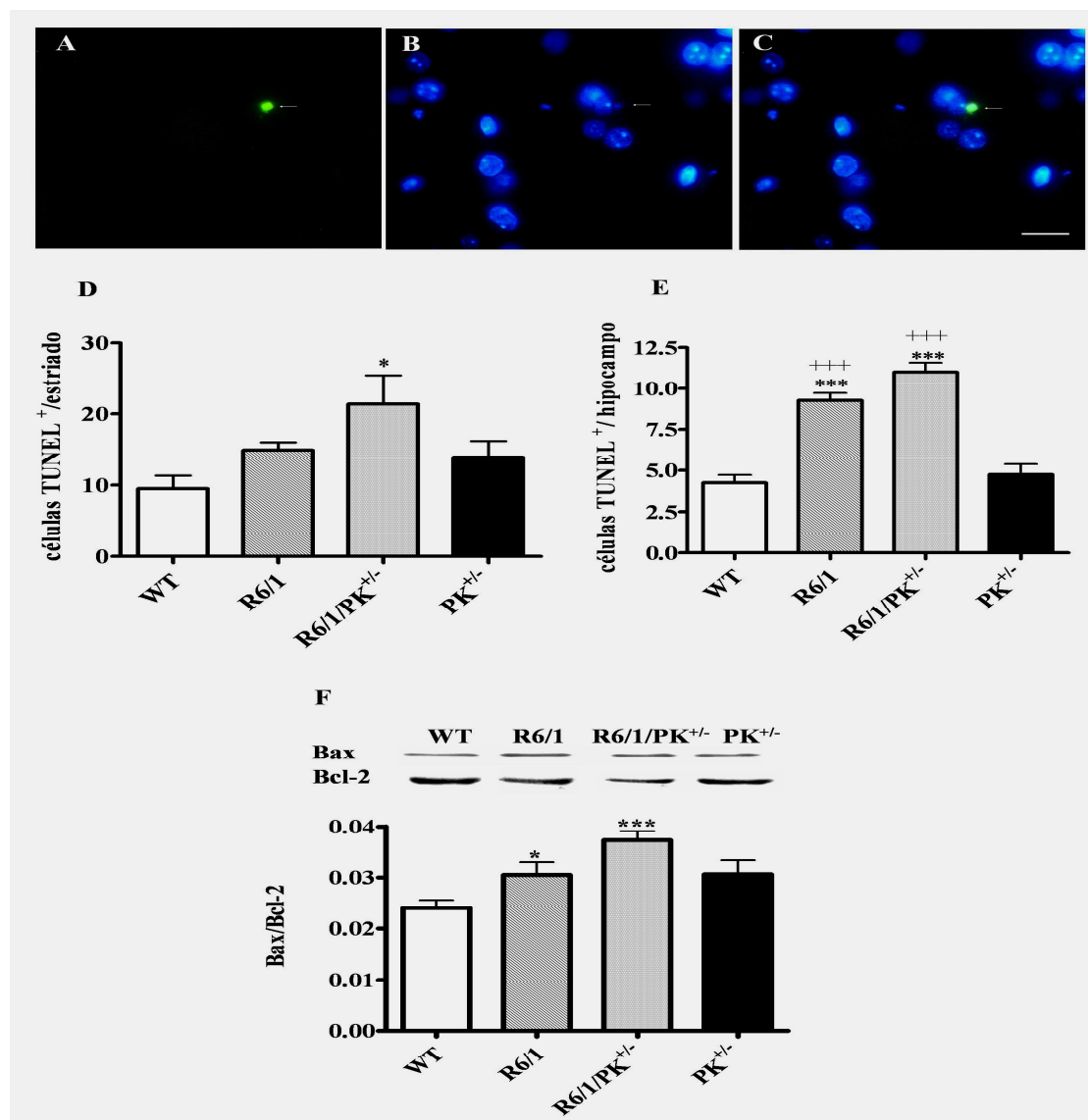


Figura 10. Muerte celular y estudio de proteínas pro y antiapoptóticas en el estriado de WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-} de 7 meses de edad. **A:** Micrografías del estriado de los ratones mostrando las células TUNEL⁺ de ratones R6/1, **B:** su correspondiente tinción de núcleos con bis-benzimida y **C:** su co-marcaje (escala = 30 μ m). **D y E:** Número de células TUNEL⁺ en estriado e hipocampo de los cuatro grupos experimentales. **F:** Cociente de las proteínas pro y antiapoptóticas (Bax/Bcl2) en el estriado. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 6 animales en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. *p<0.05, ***p<0.001 *vs* WT; +++p<0.001 *vs* PK^{+/-}.

2.4. Mecanismos moleculares en la protección celular y muerte de los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}

Con el fin de estudiar determinados mecanismos moleculares implicados en rutas de protección o de muerte celular, comenzamos a medir los niveles de compuestos implicados en estos procesos. El glutatión es un potente agente antioxidante y sus niveles aumentaron en el estriado de los ratones R6/1 y algo más en los ratones R6/1/PK^{+/-} (figura 11 A). Esto hace pensar que hay un incremento del estrés oxidativo de estos animales y que el aumento del glutatión reducido (GSH), podría ser un efecto compensatorio. Los niveles de la chaperona Hsp70, proteína implicada en el correcto plegamiento de proteínas, aumentaron en ratones PK^{+/-} con respecto a los WT y se redujeron en R6/1 y R6/1/PK^{+/-} (figura 11 B), lo que podría significar, a efectos crónicos, una pérdida de protección por parte de estas chaperonas en animales enfermos. Los niveles de la proteína co-chaperona CHIP, decayeron levemente, de manera no significativa, en los ratones R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-} (figura 11 C). La proteína LC3 II es considerada como marcador de autofagia, y la ratio LC3 II/I, aumentó en los ratones R6/1 y más en los ratones R6/1/PK^{+/-} con respecto a los ratones WT (figura 11 D).

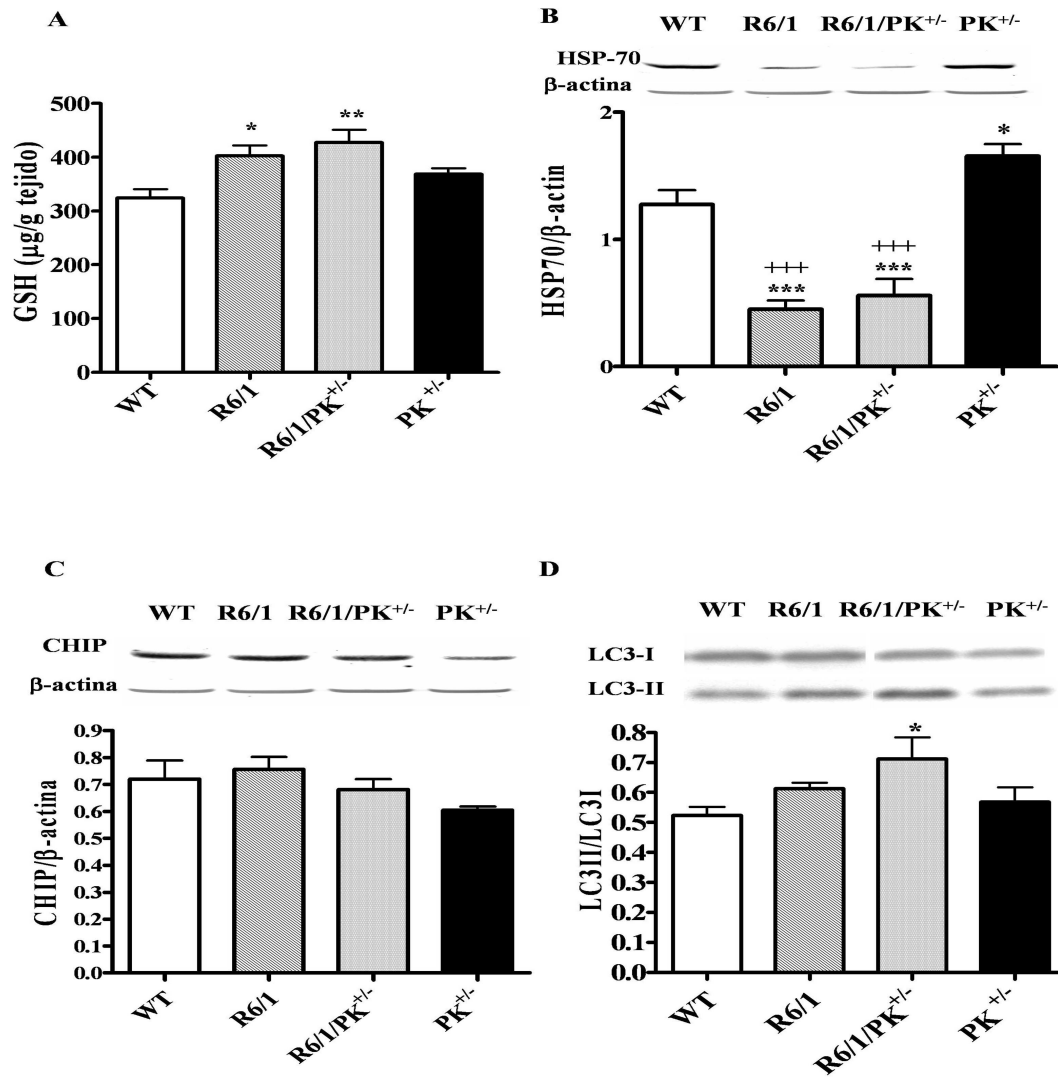


Figura 11. GSH, HSP-70, CHIP y LC-3 en el estriado de ratones WT, R6/1, R6/1/PK^{+/-} y PK^{+/-} de 7 meses de edad. **A:** Niveles de GSH. **B:** Niveles de la proteína chaperona HSP-70/β-actina, **C:** niveles de CHIP/β-actina y **D:** LC-3 II/LC-3 I en el estriado de cada grupo experimental. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 6 animales en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 *vs* WT; +++p<0.001 *vs* PK^{+/-}.

3. EFECTOS DE UNA DIETA RICA EN ACEITE DE OLIVA EN RATONES WT Y R6/1

3.1. Estudio en ratones R6/1 sintomáticos con dieta normal y suplementada con aceite de oliva durante dos meses (5-7 meses de edad)

El siguiente estudio que realizamos fue el de suministrar a los ratones una dieta rica en ácidos grasos mediante la adición de aceite de oliva al 10% en la comida. Los ratones R6/1 utilizados en el laboratorio comenzaron a presentar síntomas claros de la enfermedad en torno a los 5 meses de edad, siendo estos síntomas muy evidentes y agresivos a los 7 meses. Por ello, iniciamos el suministro de una dieta suplementada con aceite de oliva a los 5 meses que mantuvimos hasta el sacrificio a los 7 meses de edad.

3.1.1. Peso corporal, comida y bebida ingerida

Durante los dos meses de tratamiento, los ratones R6/1 tratados con dieta normal fueron perdiendo peso progresivamente, como sucede normalmente, mientras que los ratones R6/1⁺, suplementados con aceite de oliva, mantuvieron su peso e incluso engordaron levemente, mostrando diferencias estadísticamente significativas durante todo el tratamiento (figura 12 A).

Durante los dos meses de estudio, se controló semanalmente la bebida y la comida ingerida por día en ambos grupos experimentales. Pudimos apreciar un descenso en la ingesta, tanto de bebida como de comida, en los ratones que tomaban pienso enriquecido con aceite de oliva comparado con los ratones R6/1 sin suplemento de aceite (figura 12 B y C).

3.1.2. Estudio de comportamiento y fenotipo

Al igual que hicimos con anterioridad con los ratones dobles mutantes, realizamos pruebas para medir la conducta motora de los ratones R6/1 con dieta y sin dieta suplementada con aceite de oliva. En cuanto a la coordinación motora, ésta fue medida como el tiempo de permanencia en el Rota-rod y no hubo grandes diferencias entre ambos grupos de animales (figura 12 D). Tanto los ratones tratados con la dieta suplementada con aceite de oliva como los ratones sin dieta suplementada, tuvieron tiempos de permanencia en Rota-Rod muy bajos (figura 12 D).

Como se ha mencionado anteriormente, un síntoma claro de parkinsonismo, es la disminución de la longitud de la zancada. En nuestro estudio, los ratones R6/1⁺ aumentan la longitud de la zancada con la dieta suplementada con aceite de oliva, mientras que los

ratones R6/1 con dieta estándar, la disminuyen (figura 12 E). Esto podría indicar una mejoría en la sintomatología motora de los ratones R6/1⁺ tratados con aceite de oliva. También hemos estudiado la capacidad exploratoria en campo abierto, medida por el actitrack, y no hemos encontrado diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, aunque siempre el grupo tratado con aceite de oliva recorre una distancia mayor en campo abierto que el grupo control (figura 12 F). En conclusión, la administración de aceite de oliva como suplemento dietético, no modifica el deterioro de la coordinación ni el trastorno de actividad exploradora, que se observa en los ratones R6/1, pero mejora la longitud de la zancada que se considera un índice de parkinsonismo en estos ratones.

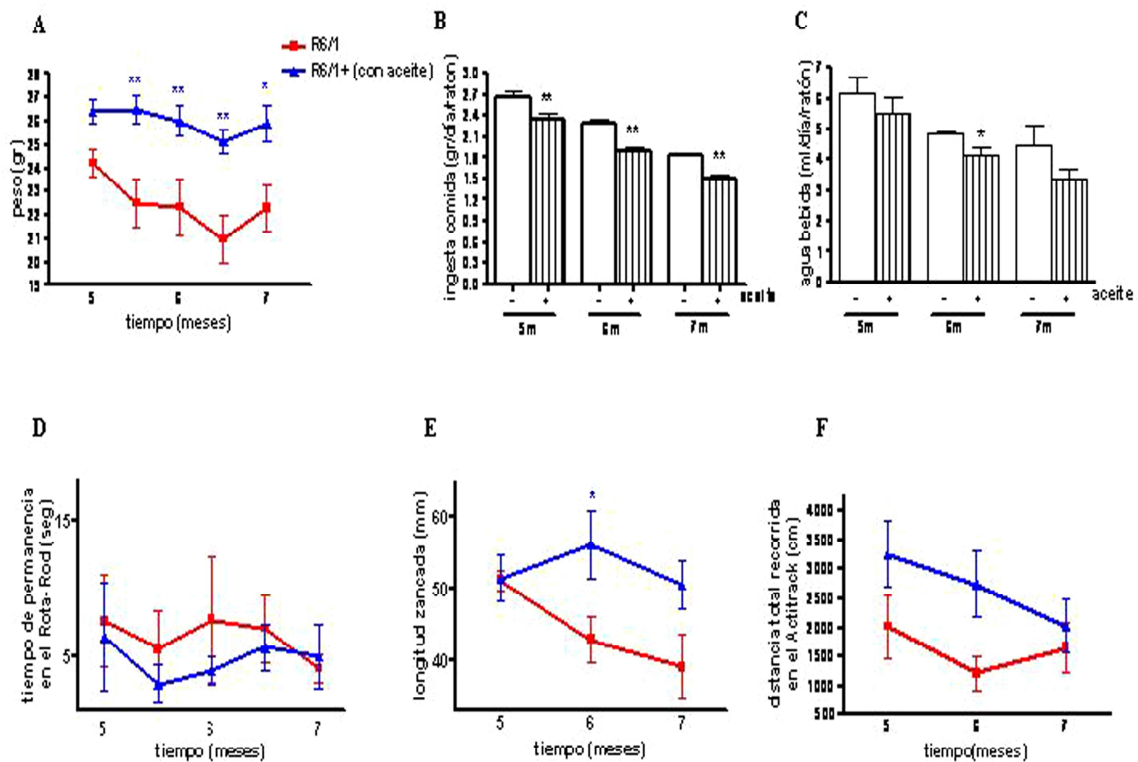


Figura 12. Estudio del fenotipo y comportamiento en ratones R6/1 sintomáticos tratados con una dieta rica en aceite de oliva durante 2 meses. Estudio del peso corporal, comida y bebida ingerida y comportamiento. **A:** Medida del peso corporal. **B:** Comida ingerida. **C:** Bebida ingerida. **D:** Tiempo de permanencia en segundos en la barra del Rota-Rod. **E:** Longitud de la zancada medida en mm. **F:** Distancia total recorrida en el Actitrack durante 10 minutos de análisis medida en cm. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 4$ muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ R6/1⁺ vs R6/1.

3.1.3. Inclusiones de huntingtina y muerte celular en distintas áreas cerebrales

Las inclusiones de huntingtina están presentes en la región del estriado y en el hipocampo de los ratones con y sin dieta suplementada con aceite de oliva (figura 13). En el estriado de los ratones R6/1 suplementados con la dieta de aceite de oliva, se redujo el número de inclusiones de huntingtina (figura 13 A). Este efecto no ocurre así en el hipocampo, donde no hay diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (figura 13 B).

En cuanto a las células TH positivas observadas en la sustancia nigra, tampoco encontramos diferencias significativas entre ratones R6/1 con aceite de oliva y R6/1. Ambos poseen un número de células TH⁺ muy bajos, característico de este modelo de enfermedad a edades avanzadas (figura 13 C).

Para ver la muerte celular en el último estadio de apoptosis, contamos las células TUNEL⁺ en el estriado de ambos grupos experimentales, y vimos un descenso significativo de la muerte celular en los ratones con dieta suplementada con aceite de oliva (figura 13 D). Por lo tanto, podemos afirmar que el aceite de oliva disminuye la apoptosis en el estriado de los ratones R6/1.

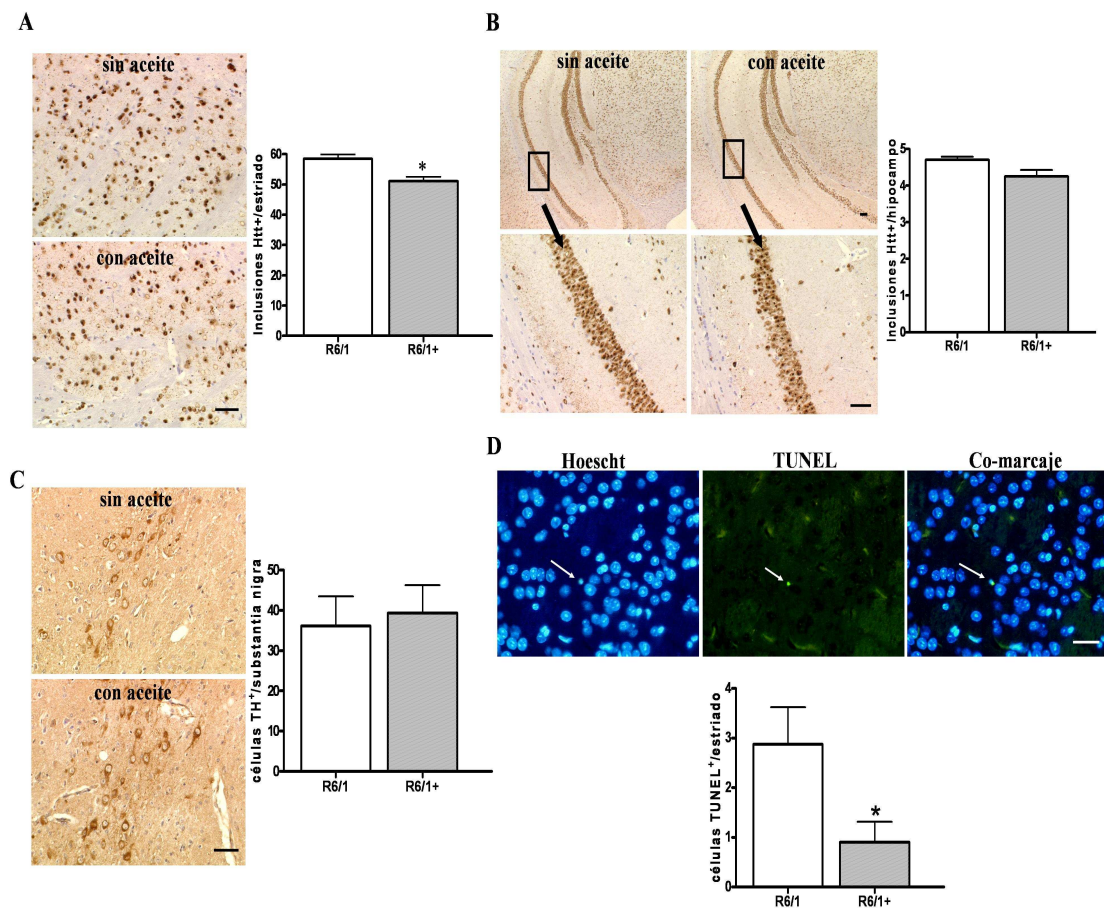


Figura 13. Estudio histológico en el estriado y el hipocampo de ratones R6/1 tratados con dieta rica en aceite de oliva durante 2 meses. **A:** Imagen representativa e histograma del número de inclusiones de huntingtina en el estriado de ratones R6/1 sin dieta y con dieta rica en aceite de oliva (escala = 50µm). **B:** Inclusiones de huntingtina en el hipocampo de ratones R6/1 sin dieta y con dieta suplementada con aceite de oliva. (Escala = 100 y 50 µm). **C:** Corte de la región de la sustancia nigra y tinción de células TH positivas (escala = 50µm). **D:** Micrografías de una célula TUNEL⁺ en el estriado y su correspondiente Hoechst y conteaje de células TUNEL⁺ (escala = 30 µm). Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 4 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante un *t*-test. **p*<0.05 R6/1⁺ vs R6/1.

3.1.4. Mecanismos moleculares

Mediante técnicas de inmunodetección, medimos los niveles de determinadas proteínas. La proteína DARPP-32, presente en las células medianas espinosas del estriado, no sufrió cambios estadísticamente significativos en sus niveles entre ambos grupos experimentales, aunque parece que hay una tendencia a una menor expresión de DARPP-32 en ratones con dieta suplementada con aceite de oliva (figura 14 A). En cuanto a los niveles de tiroxina hidroxilasa, TH, los ratones R6/1⁺ tratados con aceite de oliva aumentan su expresión en sustancia nigra (figura 14 B). Este dato que sugiere un efecto protector del aceite de oliva sobre neuronas dopaminérgicas, es congruente con el efecto del aceite de oliva sobre la longitud de la zancada, un parámetro indicativo de

parkinsonismo. Los niveles de la chaperona Hsp70 y del marcador mitocondrial citocromo C, no sufrieron variaciones con respecto a la dieta (figura 14 C y D).

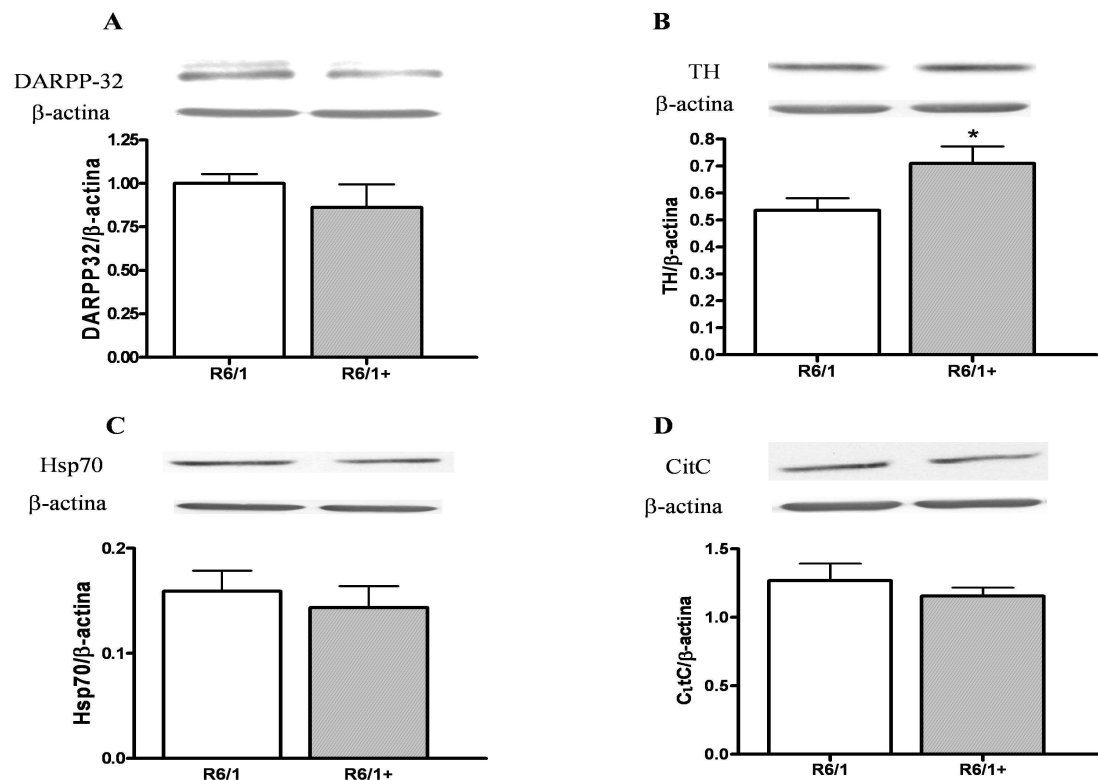


Figura 14. Expresión de las proteínas DARPP-32, tiroxina hidroxilasa, chaperona Hsp70 y citocromo C en estriado de ratones R6/1. **A:** Western blot representativo y valores de DARPP-32. **B:** TH, **C:** Hsp70 y **D:** CitC corregidos por β-actina en ratones R6/1 y R6/1⁺. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 6 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante un *t*-test. **p*<0.05 R6/1⁺ vs R6/1.

3.2. Estudio en ratones WT y R6/1 asintomáticos con dieta normal y suplementada con aceite de oliva durante cinco meses (2-7 meses de edad)

Para poder comparar los efectos de una dieta rica en aceite de oliva en ratones controles WT y ratones R6/1, realizamos un estudio más extenso, mediante administración de este compuesto durante un periodo mayor de tiempo. En este caso, comenzamos el experimento en ratones de 2 meses (asintomáticos en R6/1) hasta los 7 meses de edad. Por tanto, teníamos 4 grupos experimentales; ratones WT sin dieta suplementada y WT⁺ con dieta rica en aceite de oliva, ratones R6/1 sin suplemento de aceite y ratones R6/1⁺ con suplemento de aceite de oliva en la dieta.

3.2.1. Peso corporal, comida y bebida ingerida

Tanto los ratones WT⁺ como los R6/1⁺ tratados con aceite de oliva, ganaron peso a lo largo de los 5 meses de tratamiento con la dieta. Encontramos diferencias significativas entre los ratones WT y los R6/1 (figura 15 A). Con respecto a la cantidad de comida ingerida, a lo largo de los meses se ve una caída en la ingesta, tanto en ratones WT como en R6/1 tratados con aceite de oliva con respecto a sus controles (figura 15 B). Los ratones R6/1 comieron menos que los WT, y en ambos grupos, los que tuvieron una dieta suplementada con aceite, comieron menor cantidad de pienso. En cuanto al agua bebida, los ratones WT sin dieta bebieron regularmente la misma cantidad, no siendo así los WT⁺ que bebieron menos cantidad de agua con respecto a los WT (figura 15 C). En los ratones R6/1 ocurrió lo mismo, bebieron menor cantidad los R6/1⁺.

3.2.2. Estudios de comportamiento y del fenotipo

La coordinación motora medida por el tiempo de permanencia en el Rota-rod volvió a hacer visibles las diferencias entre WT y R6/1, pero no hubo diferencias con respecto a la dieta (figura 15 D). En cuanto a la longitud de la zancada, las diferencias siguen siendo de genotipo pero no hay diferencias significativas con respecto a la dieta (figura 15 E). Pese a ello, parece haber una tendencia al aumento de la zancada en los ratones R6/1⁺. La capacidad de exploración en campo abierto, medida por el Actitrack, refleja un aumento en ratones WT⁺ pero no vemos ningún cambio en el resto de grupos experimentales (figura 15 F). En todos los parámetros estudiados observamos una tendencia a la mejoría en ratones R6/1⁺ con respecto a ratones R6/1, pero no estadísticamente significativa.

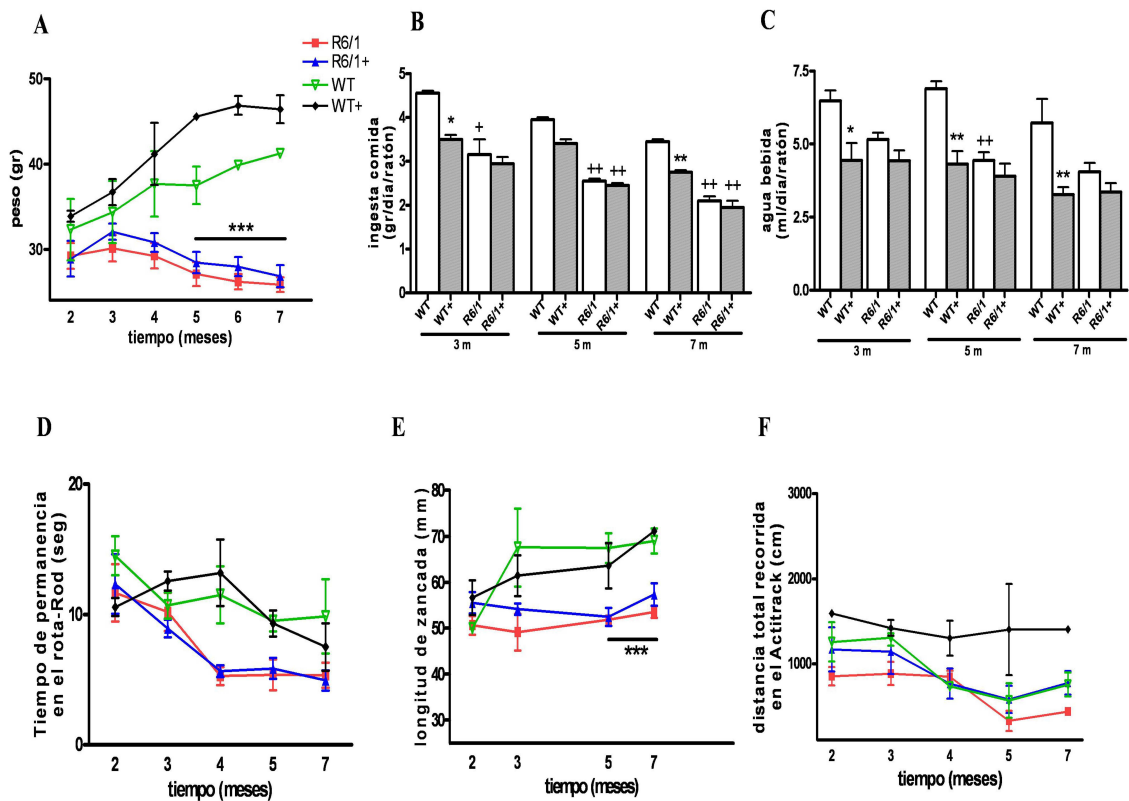


Figura 15. Estudio del fenotipo y comportamiento en ratones R6/1 y WT⁺ tratados con una dieta rica en aceite de oliva desde los 2 hasta los 7 meses de edad. **A:** Medida del peso corporal. En rojo, ratones R6/1 sin dieta suplementada con aceite; en azul, ratones R6/1⁺ con suplemento de aceite; en verde, ratones WT sin suplemento de aceite y en negro ratones WT⁺ con dieta suplementada con aceite de oliva. **B:** Comida ingerida. **C:** Bebida ingerida. **D:** Tiempo de permanencia en la barra del Rota-Rod. **E:** Longitud de la zancada, reducida en los ratones sin dieta con aceite. **F:** Distancia total recorrida en el Actitrack durante 10 minutos de análisis. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 6$ muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ dieta con aceite *vs* dieta sin aceite. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ R6/1 *vs* WT⁺.

3.2.3. Inclusiones de huntingtina en distintas áreas cerebrales

A los 7 meses de edad, tras 5 meses de dieta con aceite de oliva, los ratones fueron sacrificados y se hicieron estudios histológicos de los hemisferios. Las inclusiones de huntingtina en estriado e hipocampo (figura 16 A y B) disminuyen significativamente en el estriado (figura 16 A) de los R6/1 suplementados con aceite de oliva en los que se observa también una tendencia a la disminución en el hipocampo (figura 16 B).

3.2.4. Mecanismos moleculares

Con respecto a los mecanismos moleculares, hemos observado que la ratio de las proteínas anti-proapoptóticas Bcl2/Bax aumenta en los animales R6/1 tratados con aceite de oliva durante 5 meses (figura 16 C). Los niveles de chaperona Hsp70 no variaron con

respecto al tratamiento pero hay una disminución muy significativa con respecto al genotipo (entre WT y R6/1) (figura 16 D).

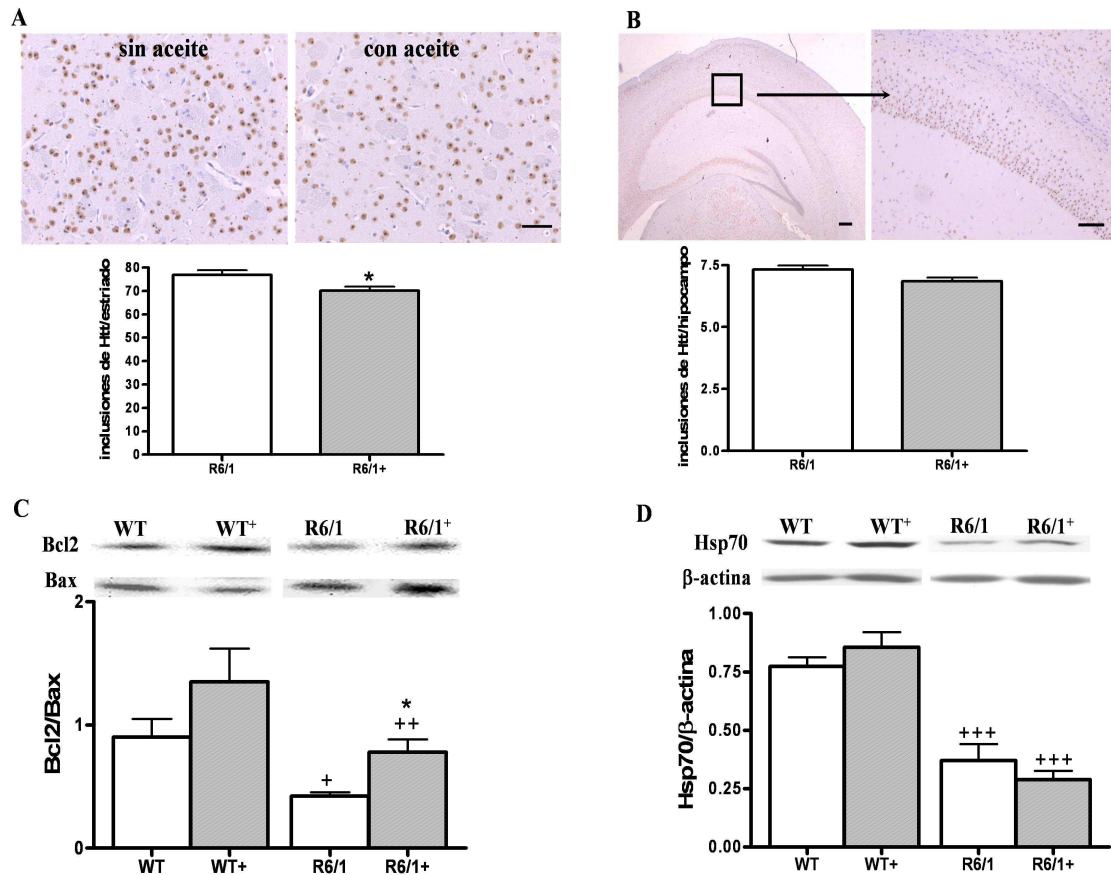


Figura 16. Inclusiones de huntingtina en diferentes regiones cerebrales y muerte neuronal. A: Micrografía representativa del estriado de ratones con y sin dieta suplementada con aceite (escala = 30µm) con su correspondiente histograma mostrando el número de inclusiones de huntingtina en el estriado de ratones R6/1 y R6/1+. **B:** Micrografía representativa del hipocampo de ratones con y sin dieta suplementada con aceite (escala = 100 y 50 µm) con su correspondiente histograma mostrando el número de inclusiones de huntingtina. **C:** Ratio de las proteínas pro-antiapoptóticas Bcl2/Bax en los cuatro grupos experimentales. **D:** Expresión de la chaperona Hsp70. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 6 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$ dieta con aceite *vs* dieta sin aceite. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ R6/1 *vs* WT.

4. EFECTOS NEUROTÓXICOS EN UN MODELO CELULAR DE HUNTINGTON

Después de estudiar posibles sistemas y mecanismos de neuroprotección en animales R6/1, decidimos utilizar un modelo *in vitro* de la enfermedad para realizar estudios de toxicidad y neuroprotección. Por ello, comenzamos a trabajar con neuronas estriatales de ratón STHdh^{Q7/7} con 7 repeticiones de glutamina como células control, y células STHdh^{Q111/111} con 111 repeticiones de glutamina como modelo de enfermedad de Huntington (cedidas amablemente por el profesor Jordi Alberch).

Queríamos ver cómo afectaban diferentes neurotóxicos a estas células y buscar mecanismos de protección frente a ellos. Por ello, utilizamos tóxicos como el aminoácido excitador glutamato sódico, el peróxido de hidrógeno causante de estrés oxidativo y la rotenona y el ácido 3-nitropropiónico como inhibidores de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial, respectivamente. Todos los estudios se realizaron en un medio definido carente de suero.

4.1. Toxicidad inducida por glutamato

Como primer modelo de toxicidad en estas células, elegimos el aminoácido excitador glutamato. Realizamos numerosas curvas dosis-respuesta y finalmente escogimos concentraciones elevadas (mM) para obtener un efecto neurotóxico y ver diferencias entre las células Q7 y Q111. Realizamos estudios de actividad mitocondrial por MTT (figura 17 A) y de muerte por necrosis midiendo la liberación de LDH al medio (figura 17 B). También vimos el porcentaje de apoptosis contando núcleos apoptóticos teñidos con bis-benzimida (figura 17 C) con dosis de glutamato sódico (1, 5, 10 y 20 mM), viendo que a más de 10 mM el efecto era demasiado letal. Finalmente, y tras varios ensayos, escogimos la dosis de 5mM para realizar los experimentos de neuroprotección. Comprobamos que esta dosis producía muerte celular observando la necrosis contando las células azul tripán positivas (figura 17 D) y vimos una disminución en la expresión de células DARPP-32 positivas, marcador de neuronas estriatales medianas espinosas (figura 17 E).

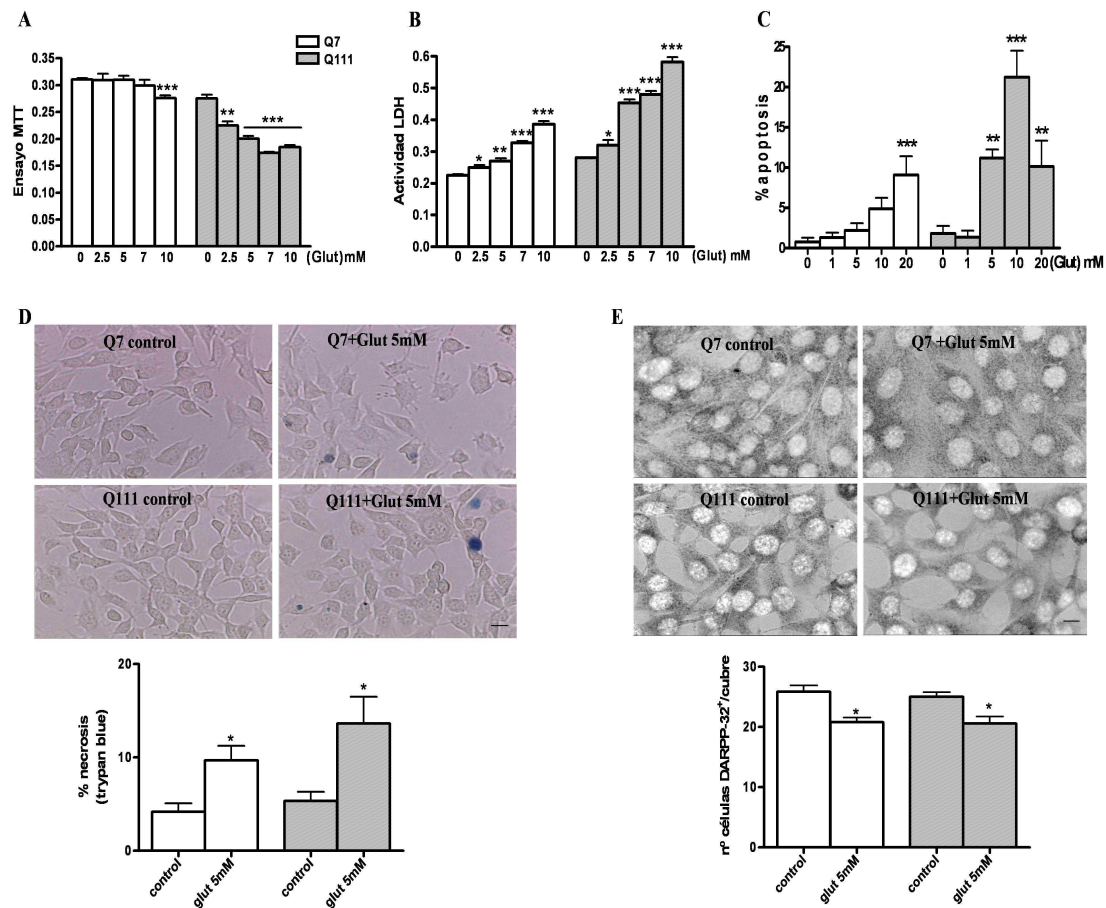


Figura 17. Tratamiento de las células STHdh^{Q7/7} y STHdh^{Q111/111} con glutamato sódico. **A:** Ensayo de viabilidad celular mediante MTT y **B:** ensayo de muerte celular con dosis de glutamato sódico de 0, 2.5, 5, 7 y 10 mM en ambos tipos de células. **C:** Porcentaje de apoptosis con dosis de glutamato sódico de 0, 1, 5, 10, 20 mM. **D:** Micrografías y conteo de células Q7 y Q111 azul tripán positivas en presencia de glutamato sódico 5 mM. **E:** Micrografías y conteo de células DARPP-32 positivas en ambos tipos celulares con glutamato sódico 5 mM (escala = 30 μ m). Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$ muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs su respectivo control.

4.2. Daño oxidativo inducido por agua oxigenada

En diversos experimentos iniciales hemos modificado las condiciones experimentales de tiempo de exposición y concentración de H_2O_2 hasta llegar a las condiciones óptimas (figura 18 A-E). A la concentración de 2 μ M durante 24 horas se observa un aumento en la necrosis (figura 18 F) y una caída en la captación de [3 H]-GABA (figura 18 G), pero siempre con un efecto tóxico mayor en las células Q111, por lo que podríamos afirmar que las células Q111 son más sensibles al estrés oxidativo que las células no mutadas Q7.

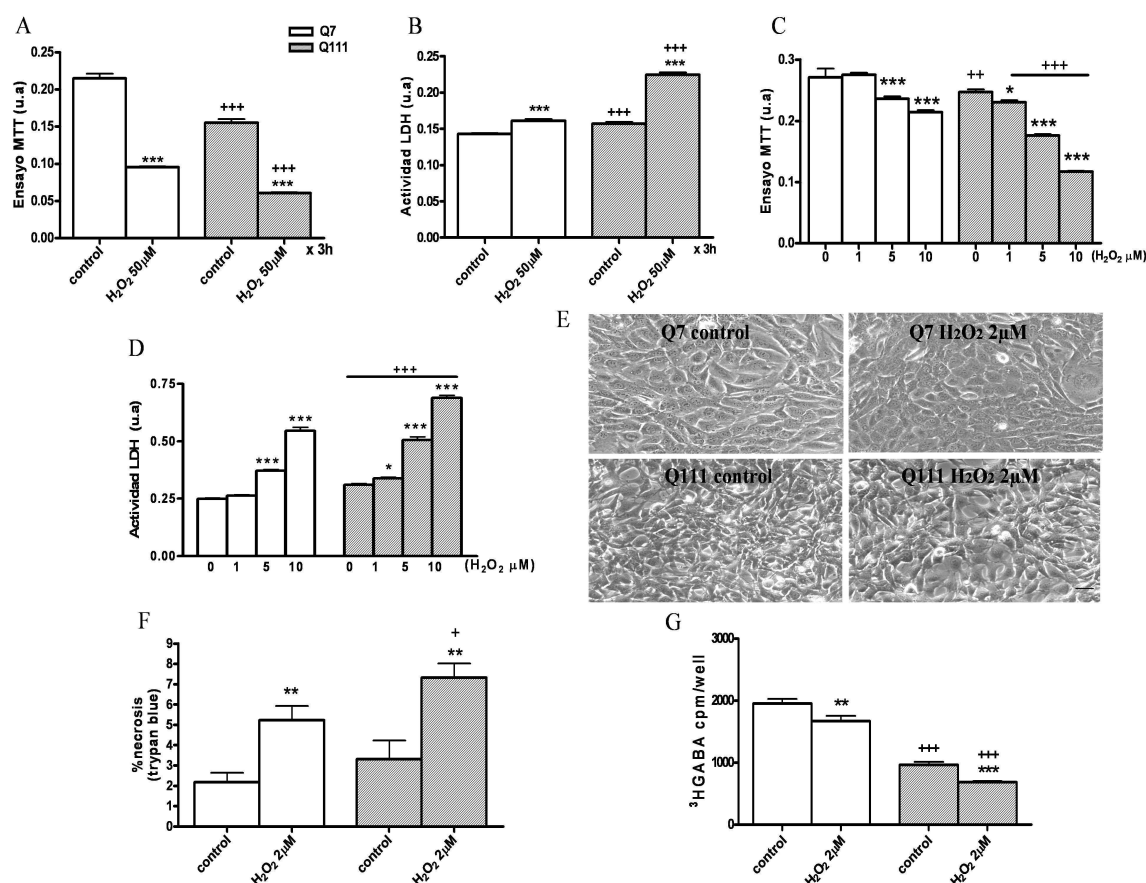


Figura 18. Tratamiento con peróxido de hidrógeno en células STHdh^{Q7/7} y STHdh^{Q111/111}. **A:** Ensayo de viabilidad celular (MTT) y **B:** de muerte por necrosis (LDH) con H_2O_2 50 μ M durante 3 horas. **C y D:** Ensayos de MTT y LDH con H_2O_2 de 0, 1, 5, 10 μ M x 24 horas. **E:** Imágenes representativas de ambos tipos celulares con H_2O_2 2 μ M x 24 horas (escala = 30 μ m). **F:** Porcentaje de células necróticas mediante conteo de células trypan blue positivas en células Q7 y Q111 tratadas con H_2O_2 2 μ M x 24h. **G:** Captación de 3H -GABA en ambos tipos celulares con H_2O_2 2 μ M x 24h. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 5 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 *vs* su respectivo control. ++ p <0.01, +++ p <0.001 Q111 *vs* Q7.

4.3. Daño mitocondrial inducido por rotenona y ácido 3 nitropropiónico (3NP)

La cadena respiratoria mitocondrial está alterada en la enfermedad de Huntington, por ello, hemos utilizado dos inhibidores, la rotenona y el ácido 3NP, de los complejos I y II respectivamente. El ácido 3NP en dosis de 1.25 mM hasta 10 mM en medio definido (figura 19 A-B) produce toxicidad dosis dependiente que resulta demasiado tóxica para las células a concentraciones de 10 mM. Por lo tanto, escogimos la dosis de 2 y 2.5 mM para realizar los experimentos. En cuanto a la rotenona, realizamos una curva dosis desde 0.05 hasta 2 μ M (figura 20 A-C) eligiendo dos dosis, 0.1 y 0.5 μ M para los posteriores experimentos.

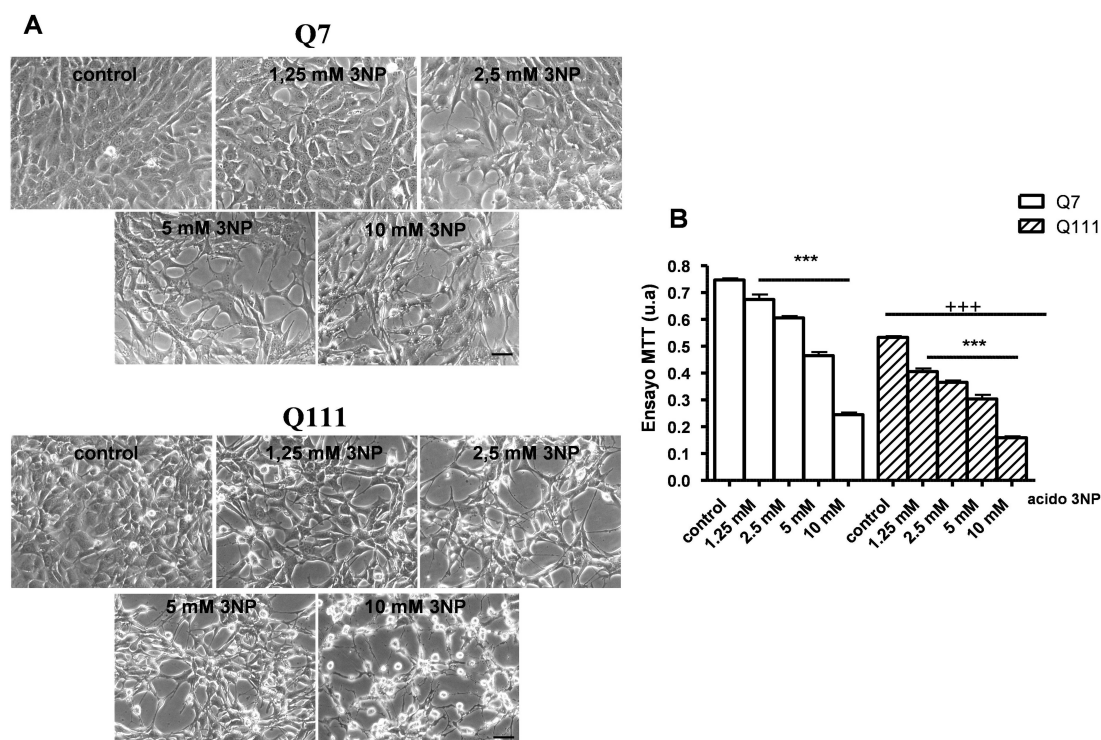


Figura 19. Tratamiento con ácido 3-nitropropiónico en células STHdh^{Q7/7} y STHdh^{Q111/111}. A: Micrografías del efecto de diferentes dosis (0, 1,25, 2,5, 5 y 10 mM) de 3NP sobre ambos tipos celulares en medio definido (escala = 30 μ m). **B:** Viabilidad celular medida mediante ensayo MTT. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 5 muestras de cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs su respectivo control.

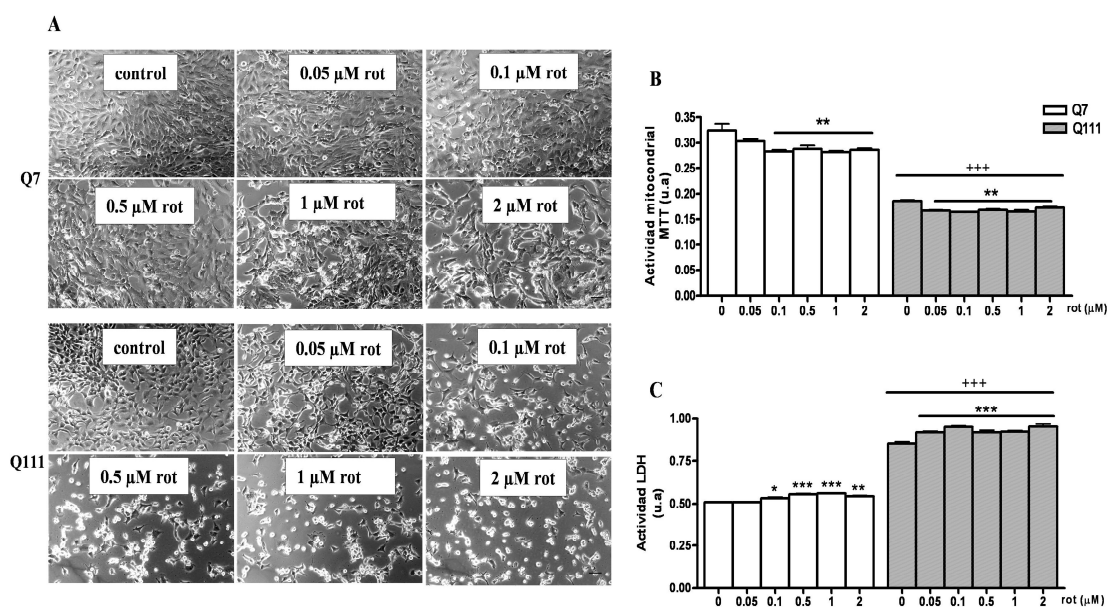


Figura 20. Curva dosis de la rotenona en células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. A: Micrografía representativa de diferentes dosis de rotenona (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2 μ M) en medio definido (escala = 50 μ m). **B y C:** ensayos de actividad mitocondrial (MTT) y muerte celular (LDH) en ambos tipos de células. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 5 muestras de cada grupo experimental). Análisis

estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *vs* su respectivo control. +++ $p < 0.001$ Q111 *vs* Q7.

5. EFECTOS PROTECTORES Y REGENERADORES EN UN MODELO CELULAR DE HUNTINGTON

Con el objetivo de estudiar mecanismos de neuroprotección en la enfermedad de Huntington, comenzamos a probar dos sustancias potencialmente neuroprotectoras, en las células STHdH. Primero realizamos experimentos con el estabilizador de dopamina (-)-OSU6162 cedido amablemente por NeuroSearch. Seguidamente, utilizamos el medio condicionado de glía (MCG), un medio producido por las células de glía en situaciones de estrés (enriquecido en antioxidantes y factores neurotróficos) (de Bernardo et al., 2003; Mena et al., 2002). Ambas sustancias se utilizaron para proteger a las células del daño provocado por los 3 neurotóxicos mencionados previamente.

5.1. Estudio molecular del fármaco (-)- OSU6162 en células Q7 y Q111

5.1.1. Efectos del (-)- OSU6162 sobre células Q7 y Q111

La curva dosis-respuesta de (-)- OSU6162 reveló que las dosis desde 3 a 150 μM en medio definido producen un aumento dosis-dependiente de la actividad mitocondrial, tanto en células Q7 como en células Q111, medido por el ensayo de MTT (figura 21 A). Las células Q111 sin tratar tuvieron niveles más elevados de LDH, lo que nos sugiere una mayor necrosis en las células que contienen la huntingtina mutada. (-)-OSU6162 reduce los niveles de LDH en las células Q111 en el rango de dosis investigado (figura 21 B), reduce el número de células azul tripán positivas (figura 21 C y D) y el número de células teñidas con ioduro de propidio (figura 21 E y F). Por lo tanto, podemos asegurar que las células Q111 son más sensibles a la carencia de suero en el medio que las Q7 y que el (-)-OSU6162 150 μM protege frente a la muerte provocada por esta falta de suero fetal.

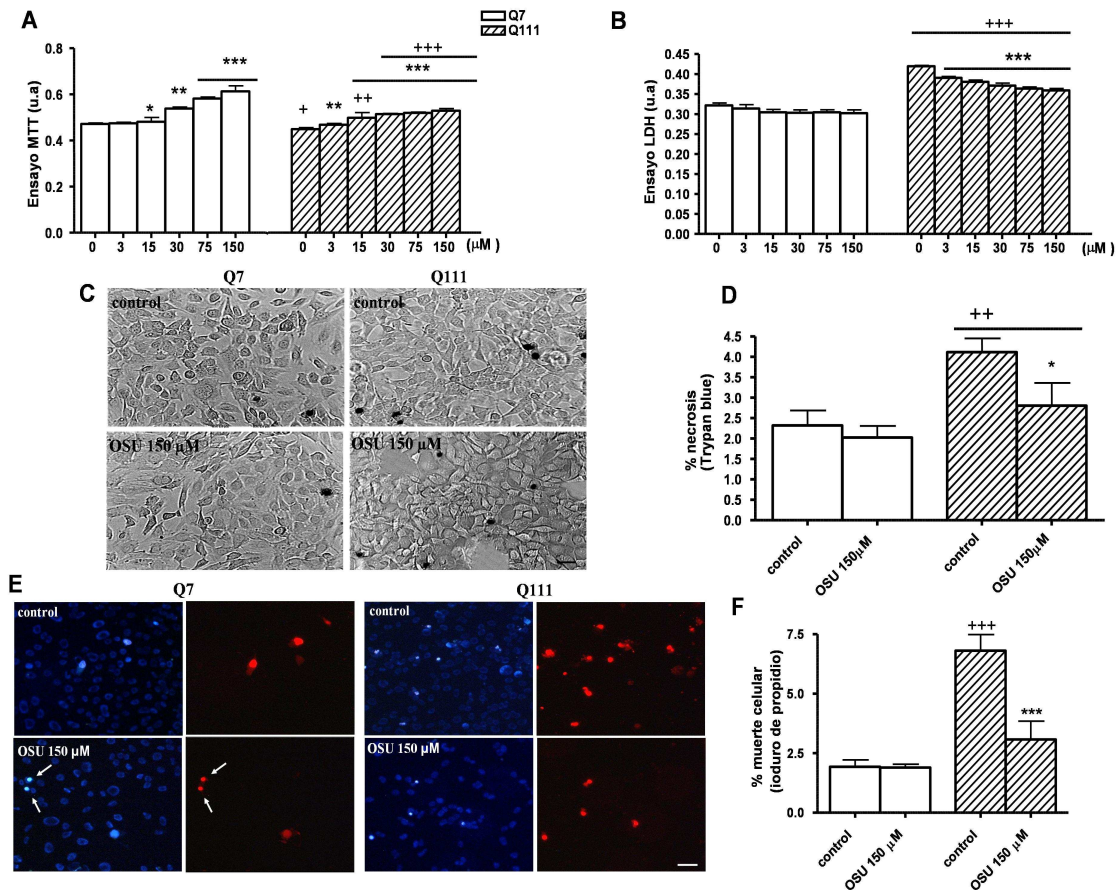


Figura 21. Curva dosis-respuesta de los efectos del (-)-OSU6162 en células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. **A:** Efectos del (-)-OSU6162 desde 0 a 150 μM sobre la actividad mitocondrial de células Q7 y Q111. **B:** Actividad LDH. **C:** Imágenes representativas de células teñidas con azul tripán (células necróticas) (escala = 30 μm). **D:** Porcentaje de muerte celular. **E:** Imágenes de la tinción con Hoechst y con ioduro de propidio. **F:** Porcentaje de células muertas, expresado como el ratio de células apoptótica y necróticas / células totales. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 5-8 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 *vs* su respectivo control; +*p*<0.05, ++*p*<0.01, +++*p*<0.001 Q111 *vs* Q7.

5.1.2. Efectos neuroprotectores del fármaco (-)- OSU6162 sobre la muerte celular inducida por glutamato sódico, H₂O₂, ácido 3NP y rotenona en células Q7 y Q111

El glutamato sódico, 5 mM, disminuye la viabilidad celular de manera mas acusada en las células Q111, efecto que el (-)- OSU6162 es incapaz de revertir (figura 22 A). Con respecto a la muerte por necrosis medida por liberación de LDH, observamos lo mismo, (-)- OSU6162 no protege frente a la toxicidad inducida por glutamato (figura 22 B).

El H₂O₂ 2μM durante 24 horas disminuye los niveles de MTT en células Q7 y Q111 (figura 23 A) y eleva el porcentaje de apoptosis y los niveles de LDH (figura 23 B-E). Las células Q111 son más sensibles al estrés oxidativo producido por el H₂O₂ que las

células Q7. Estos efectos se inhiben con el (-)-OSU6162, 150 μ M en Q7 y Q111 (figura 23 A-E). Además, el H₂O₂, 2 μ M, aumenta el número de células azul tripán positivas en ambos tipos celulares. Las células Q111 son más sensibles al efecto tóxico que las células Q7, el efecto tóxico fue contrareestado por el (-)-OSU6162, 150 μ M en ambos tipos celulares (figura 23 B y C).

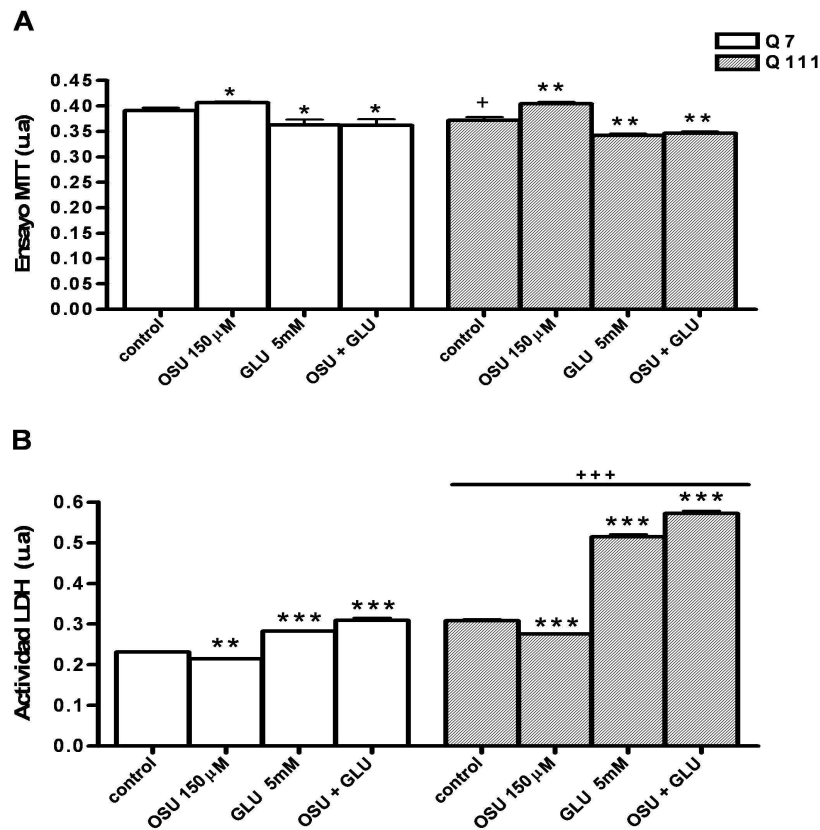


Figura 22. (-)-OSU6162 no protege frente a la toxicidad inducida por glutamato sódico en células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. Tratamiento de células Q7 y Q111 con glutamato sódico 5mM y (-)-OSU6162, 150 μ M, durante 24 horas en medio definido. **A:** Niveles de MTT. **B:** Actividad LDH. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs su respectivo control; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ Q111 vs Q7.

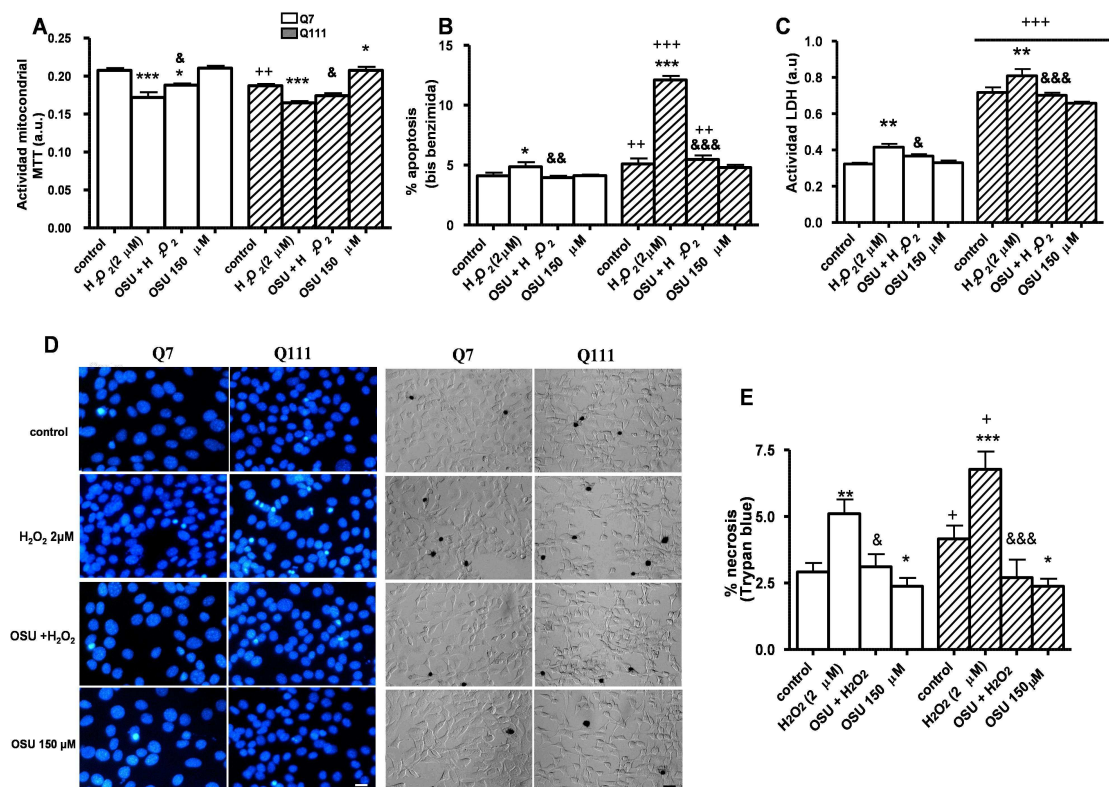


Figura 23. (-)-OSU6162 protege frente a la toxicidad inducida por H₂O₂ en las células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. Tratamiento de las células Q7 y Q111 con H₂O₂ 2 μM y (-)-OSU6162, 150 μM durante 24 horas en medio definido. **A:** Ensayo MTT. **B:** Porcentaje de células azul tripán positivas. **C:** Actividad LDH. **D:** Imágenes representativas de las células Q7 y Q111 en apoptosis y trypan blue positivas, tratadas con H₂O₂ 2 μM, o con H₂O₂, 2 μM y (-)-OSU6162 (150 μM) en medio definido (escala = 30 μm). **E:** Porcentaje de apoptosis expresado como el número total de núcleos teñidos con bis-benzimida. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 5 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 *vs* su respectivo control; +*p*<0.05, ++*p*<0.01, +++*p*<0.001 Q111 *vs* Q7. &*p*<0.05, &&*p*<0.01, &&&*p*<0.001 OSU + H₂O₂ *vs* H₂O₂ 2 μM.

Con el fin de estudiar el efecto protector del tratamiento con (-)-OSU6162, estudiamos el efecto del fármaco frente a daño mitocondrial. Para ello, utilizamos la rotenona (0.1 y 0.5 μM) y el ácido 3NP 2mM (figuras 24 y 25). La rotenona desde 0.05 hasta 2 μM, produjo un aumento dosis dependiente de la muerte celular observándose cambios morfológicos como una disminución en el tamaño de las células y en sus extensiones, así como una reducción en la actividad mitocondrial (figura 24 A y B). Hemos comprobado los efectos de la rotenona eligiendo las dosis de 0.1 y 0.5 μM con el (-)-OSU6162 150 μM. El número de células azul tripán positivas y los niveles de LDH (figura 24 C-E) aumentaron con la rotenona, pero este efecto fue revertido en presencia del (-)-OSU6162 en ambos tipos células Q7 y Q111. Estos resultados sugieren que el (-)-

OSU6162 mejora la disfunción del complejo I mitocondrial dañado por la presencia de rotenona en el medio tanto en células Q7 como en Q111.

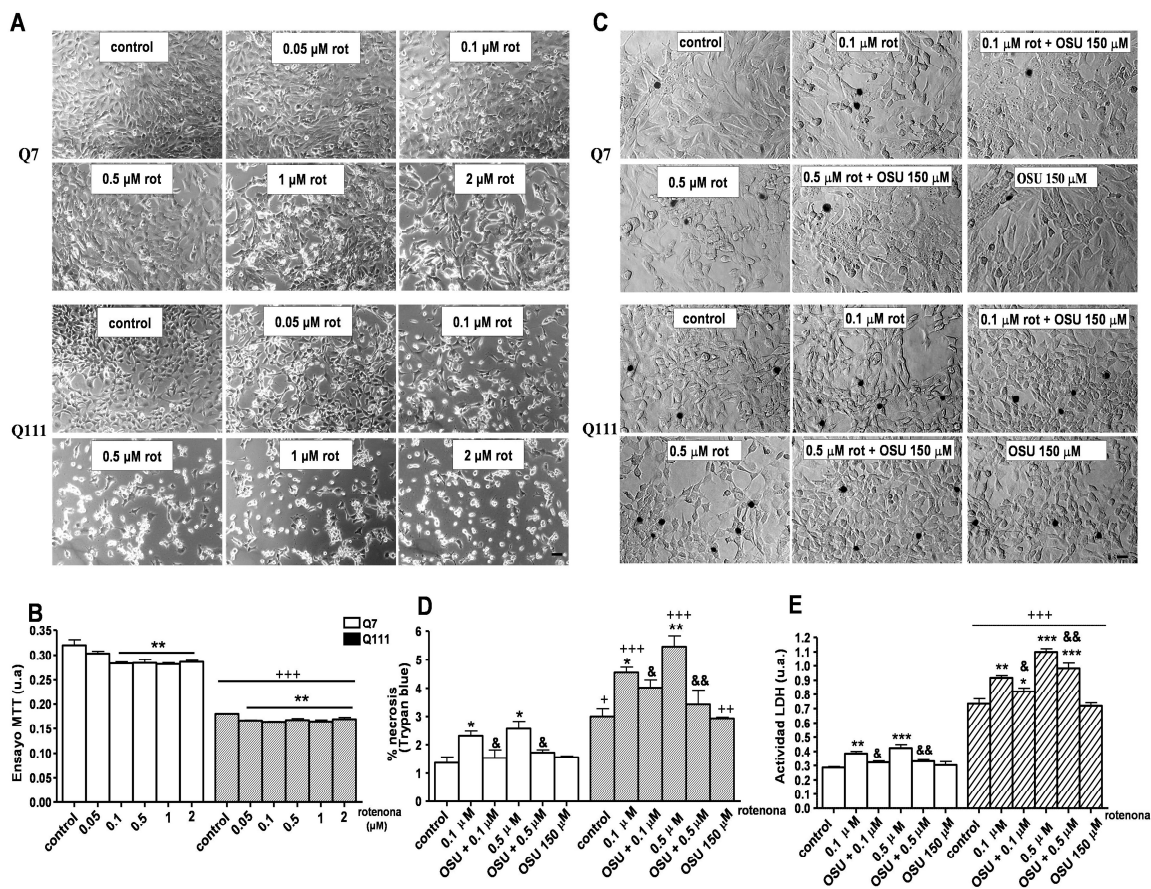


Figura 24. (-)-OSU6162 protege frente a la toxicidad inducida por rotenona en las células STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. **A:** Curva dosis-respuesta de células Q7 y Q111 tratadas con rotenona (0.05 μM a 2 μM) en medio definido durante 24 horas. Imágenes representativas de contraste de fase (escala = 50 μm). **B:** Ensayo MTT. **C:** Tratamiento de Q7 y Q111 con rotenona 0.1 y 0.5 μM, con (-)-OSU6162 150 μM y con rotenona 0.1 and 0.5 μM + (-)-OSU6162, 150 μM, durante 24 horas en medio definido. Imágenes representativas de la tinción con azul tripán. (Escala = 30 μm). **D:** Porcentaje de células necroticas. **E:** Actividad LDH. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 5 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 *vs* su respectivo control; +*p*<0.05, ++*p*<0.01, +++*p*<0.001 Q111 *vs* Q7. &*p*<0.05, &&*p*<0.01 OSU + rotenona *vs* rotenona.

El ácido 3-NP en dosis de 1.25 a 10 mM, produce un aumento dosis dependiente de la muerte celular y una reducción de los niveles de MTT en Q7 y Q111 (figura 19 A y B). Las células Q111 son más sensibles a la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial a la dosis de 2mM de 3-NP. El tratamiento con (-)-OSU6162, a concentraciones de 150 y 300 μM, previene los efectos nocivos del 3NP. Disminuye el número de células azul tripán positivas, disminuye la apoptosis (figura 25 A-D) y disminuye el número de células muertas teñidas con ioduro de propidio (figura 26). Estos

resultados nos muestran que el compuesto (-)-OSU6162 mejora la disfunción del complejo II mitocondrial provocada por el tóxico 3NP en células Q7 y Q111. En conjunto con los resultados de la rotenona, estos datos nos sugieren que este fármaco mejora el daño mitocondrial en modelos celulares de enfermedad de Huntington.

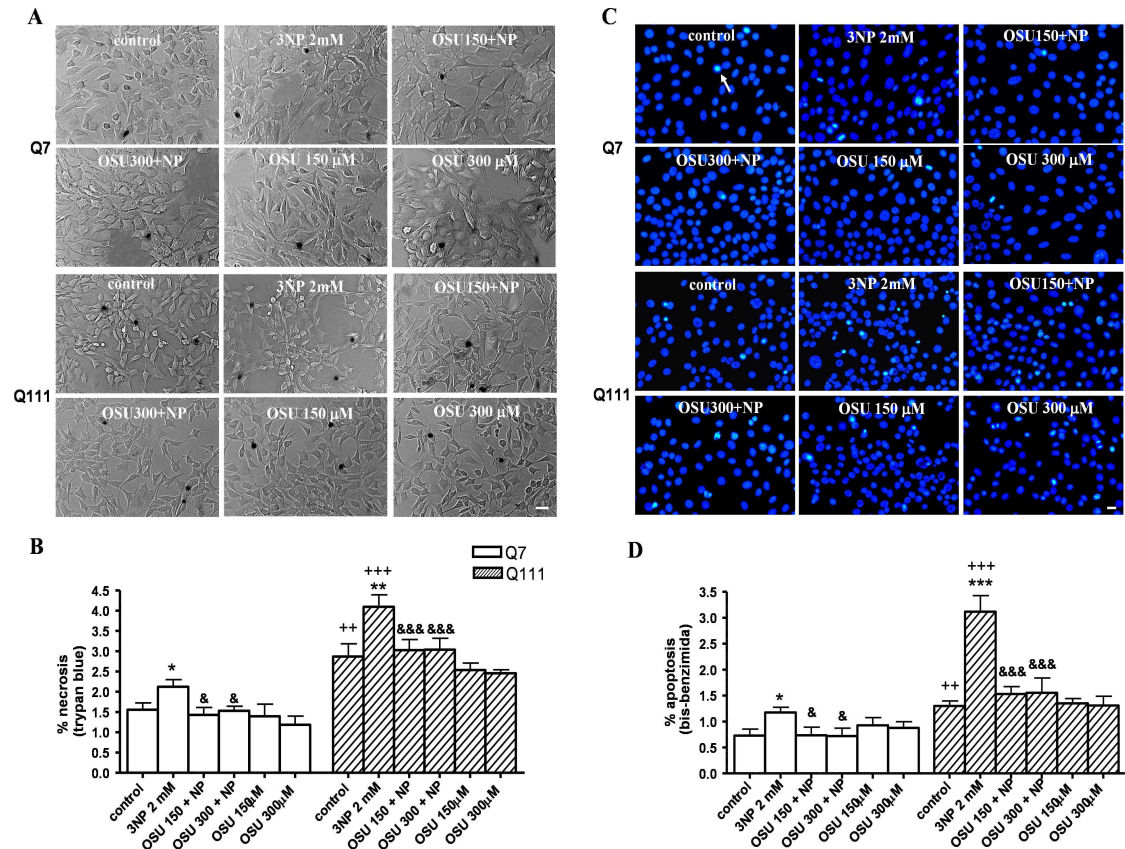


Figura 25. (-)-OSU6162 disminuye la muerte provocada por el ácido 3NP en ambos tipos celulares STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111}. Las células Q7 y Q111 fueron tratadas con ácido 3NP 2 mM y (-)-OSU6162, 150 y 300 μM, durante 24 horas en medio definido. **A:** Micrografías representativas del ensayo con azul tripán (escala = 30 μm). **B:** (-)-OSU6162 produce una reducción del porcentaje de células azul tripán positivas en las células Q111 y Q7. **C:** Imágenes de los núcleos celulares teñidos con bis-benzimida (Hoechst 33342). (Escala = 30 μm). **D:** Porcentaje de células apoptóticas. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 5 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 *vs* su respectivo control; ++*p*<0.01, +++*p*<0.001 Q111 *vs* Q7; &&&*p*<0.01, &&&&&&&*p*<0.001 OSU + 3NP *vs* 3NP.

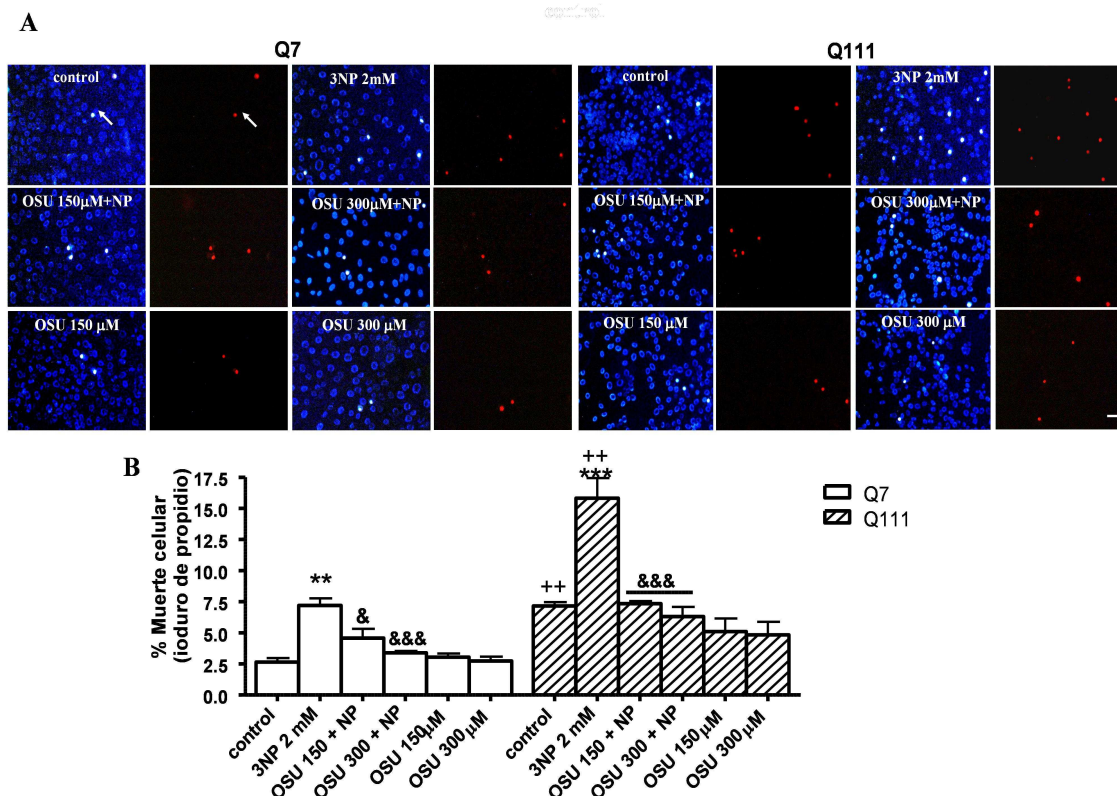


Figura 26. Muerte celular en células Q7 y Q111 tratadas con ácido 3NP y (-)-OSU6162. Las células STHdhQ7 y Q111 fueron tratadas con 3NP 2 mM y/o (-)-OSU6162, 150 y 300 µM, durante 24 horas en medio definido. Estas fueron teñidas con bis-benzimida (Hoechst 33342) y ioduro de propidio. **A:** Micrografías representativas de los núcleos totales teñidos con bis-benzimida (azul) y la muerte celular con tinción de ioduro de propidio que penetra en las células muertas (rojo). Escala = 30 µm). **B:** Porcentaje de muerte celular. (-)-OSU6162 produce una reducción dosis-dependiente del porcentaje de células teñidas con ioduro de propidio. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 5 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs su respectivo control; ++ $p < 0.01$ Q111 *vs* Q7; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ OSU + 3NP *vs* 3NP.

5.1.3. Efectos del (-)- OSU6162 sobre los niveles de BDNF

Para determinar si el efecto neuroprotector del (-)-OSU6162 estaba mediado por un aumento en los niveles de BDNF, las células Q7 y Q111 fueron tratadas con el fármaco (150 µM) y con H₂O₂ (2 µM) durante 24 horas y se midieron los niveles extra e intracelulares de BDNF (figura 27 A). Las células mutadas Q111 sin tratamiento, mostraron menores niveles de BDNF tanto extracelulares como intracelulares, que las células Q7 (figura 27 A y B) (~ 70 % de reducción, $p < 0.001$), sugiriendo que las células Q111 producen y liberan menos BDNF que las células Q7.

Como ya está descrito (Ruiz, et al., 2012), el tratamiento con H₂O₂, disminuye los niveles de BDNF en las células Q7, pero no en las células Q111 mutadas, probablemente

porque los niveles basales de BDNF en estas células estaban muy cerca del nivel de detección. El co-tratamiento con H₂O₂ y (-)-OSU6162 aumenta los niveles intracelulares, no así los extracelulares, de BDNF en las células Q111 pero no en las células Q7.

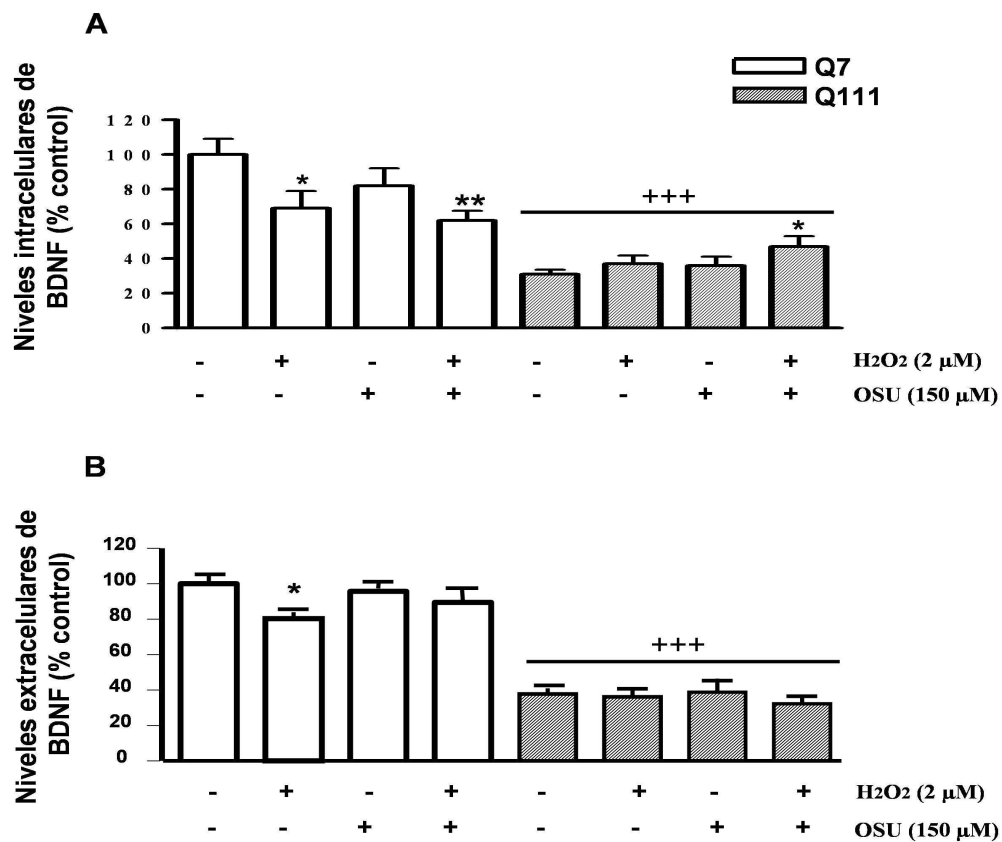


Figura 27. Efectos del (-)-OSU6162 sobre los niveles de BDNF. Las células Q7 y Q111 fueron tratadas con (-)-OSU6162 (150 uM durante 1 hora) y después se trataron con H₂O₂ (2 μM) durante 24 horas en medio definido. **A:** Niveles de BDNF intracelular obtenido a partir de extracto celular y medidos por ELISA. El histograma representa los niveles de BDNF intracelular expresado en porcentaje con respecto a las células Q7 no tratadas. **B:** El medio de cultivo fue recogido y los niveles de BDNF extracelular se midieron por ELISA. Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 4 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante el test T-Student. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs grupo control; +++*p* < 0.001 Q111 vs Q7.

5.1.4. Mecanismos moleculares de muerte y protección celular del estabilizador dopaminérgico (-)- OSU6162.

El tratamiento con (-)-OSU6162 150 μ M durante 24 horas, aumenta el cociente Bcl2/Bax en las células Q111 (figura 28 A). Esto sugiere un incremento en la supervivencia de las células mutadas frente al estrés oxidativo producido por el medio definido. (-)-OSU6162 también disminuye los niveles de p-ERK tanto en las células Q7 como Q111, lo que sugiere una prevención de la muerte celular en ambas líneas celulares (figura 28 B). (-)-OSU6162 150 μ M disminuyó los niveles de la co-chaperona CHIP (proteína que se induce en situaciones de estrés oxidativo) en las células mutadas (figura 28 C). El (-)-OSU6162 150 μ M no provocó ninguna modificación en los niveles del antioxidante glutatiión en ningun tipo celular (figura 28 D) aunque podemos resaltar que las células Q111 sufrieron una caída dramática en los niveles de glutatiión intracelular debido a la ausencia de suero en el medio con respecto a las células Q7. Por lo tanto, el fármaco (-)-OSU6162 podría estar actuando vía ERK protegiendo a las células de la muerte celular y aumentando la expresión de la proteína mitocondrial anti-apoptótica Bcl-2.

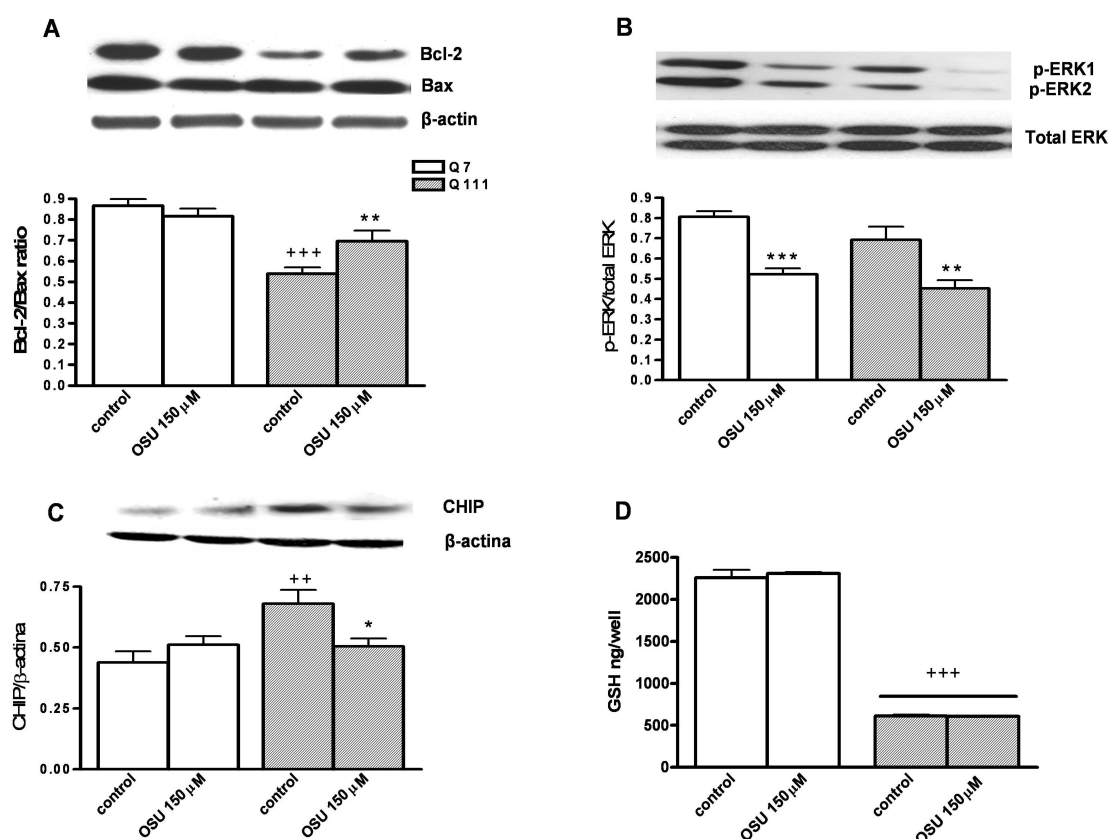


Figura 28. Efectos del (-)-OSU6162 sobre mecanismos moleculares de muerte y protección en células STHQ7/111. **A:** (-)-OSU6162 aumenta el ratio anti-/pro- apoptotico de Bcl2/Bax en las células mutadas Q111 pero no en las células Q7. **B:** (-)-OSU6162 reduce el ratio p-ERK/total ERK en ambos tipos celulares. **C:** (-)-OSU6162 disminuye los elevados niveles de CHIP en células Q111. **D:** (-)-OSU6162 no modifica los niveles de

GSH en ambos tipos celulares. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una y dos vías seguido del test “Newman-Keuls” y Bonferroni, respectivamente. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ *vs* su respectivo grupo control; $++p < 0.01$, $+++p < 0.001$ Q111 *vs* Q7. Existe interacción entre el genotipo y el (-)-OSU6162 en los ratios de Bcl2/Bax $F(1,36) = 7.19$, con una p de 0.0110 y en la expresión de la co-chaperona CHIP $F(1,15) = 8.12$, con una p de 0.0122.

5.1.5. Captación y liberación de ^3H -dopamina en células embrionarias de mesencéfalo de ratón.

Puesto que el estriado está inervado por las terminaciones procedentes de la sustancia nigra, quisimos estudiar cómo cambiaban los niveles de dopamina en presencia del fármaco. Debido a que nuestras células estriatales son un sistema aislado, realizamos los experimentos de captación y liberación de dopamina marcada con tritio en neuronas en estadio E13 de mesencéfalo de ratones WT (Mena et al., 1996; Itier et al., 2003). La captación de alta afinidad de ^3H -DA se vio aumentada significativamente en los cultivos fetales de mesencéfalo en presencia del (-)-OSU6162 150 μM (figura 29 A).

La liberación basal de ^3H -DA y la liberación provocada por K^+ , que indica liberación de DA vesicular, fueron similares en las células E13 tratadas con (-)-OSU6162 150 μM o solvente (figura 29 B). Sin embargo, la liberación de ^3H -DA inducida por anfetamina, que indica la liberación de DA recién sintetizada, fue significativamente mayor en células E13 tratadas con el (-)-OSU6162 150 μM durante 24 horas (figura 29 B). Esto nos lleva a pensar que el fármaco quizá esté potenciando la síntesis de novo de DA en las células estriatales mutadas Q111.

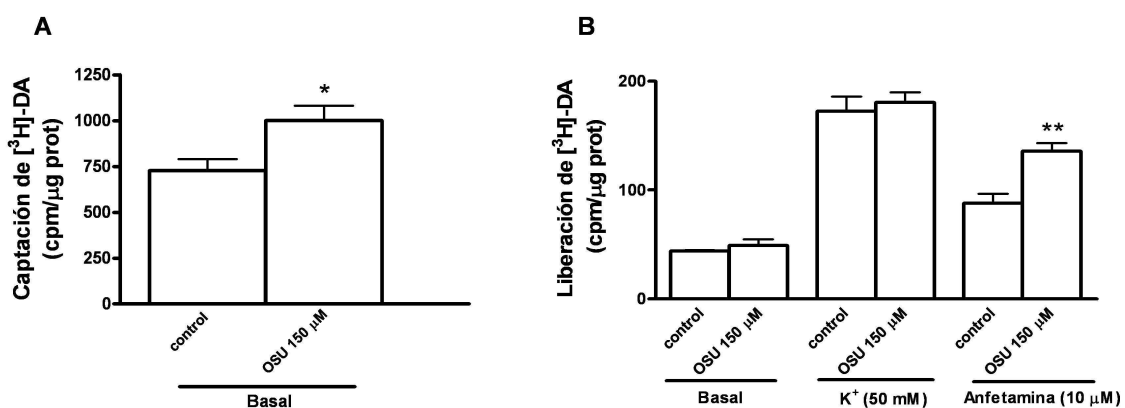


Figura 29. Captación y liberación de ^3H -DA en neuronas de cultivos primarios de mesencéfalo de ratones WT. **A:** (-)-OSU6162 aumenta la captación de DA en cultivos de mesencéfalo fetales (E13). **B:** (-)-OSU6162 no cambia los niveles básicos de la liberación de DA inducida por K^+ , pero aumenta los niveles inducidos por anfetamina. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$ muestras en cada grupo

experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *vs* su respectivo control.

5.2. Efectos del medio condicionado de glia (MCG) sobre células Q111

5.2.1. Efectos del MCG estriatal fetal (E16) y glutamato sódico en células Q111 y Q7

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado el efecto protector de este medio condicionado en modelos de la enfermedad de Parkinson (Canals et al., 2001; Mena et al., 1996; Mena et al., 1997; Mena et al., 2002). Tratamos con glutamato sódico 5 mM durante 24 horas las células Q7 y Q111, lo que provocó una reducción de la actividad mitocondrial y aumentó la muerte por necrosis. Sin embargo, estos efectos fueron revertidos en las células mutadas Q111 cuando previamente el medio definido se sustituyó por el MCG estriatal fetal (figura 30 A-C).

También quisimos estudiar la protección del MCG fetal en las células Q111 en cuanto a la captación de [3 H]-GABA (figura 30 D). Observamos que las células Q111 disminuyen de manera significativa la captación de GABA tritiado cuando se añade al medio definido glutamato sódico 5mM, sin embargo, al añadir este tóxico al MCG fetal este efecto se vio revertido. Parece que el poder neurotrófico y antioxidante del MCG estaría protegiendo frente al daño provocado por el exceso de glutamato en el medio. A partir de este punto, decidimos utilizar como modelo celular sólo las células que poseen la huntingtina mutada Q111, y ver si el MCG tenía efectos neuroprotectores frente a diferentes tóxicos en este modelo de la enfermedad de Huntington.

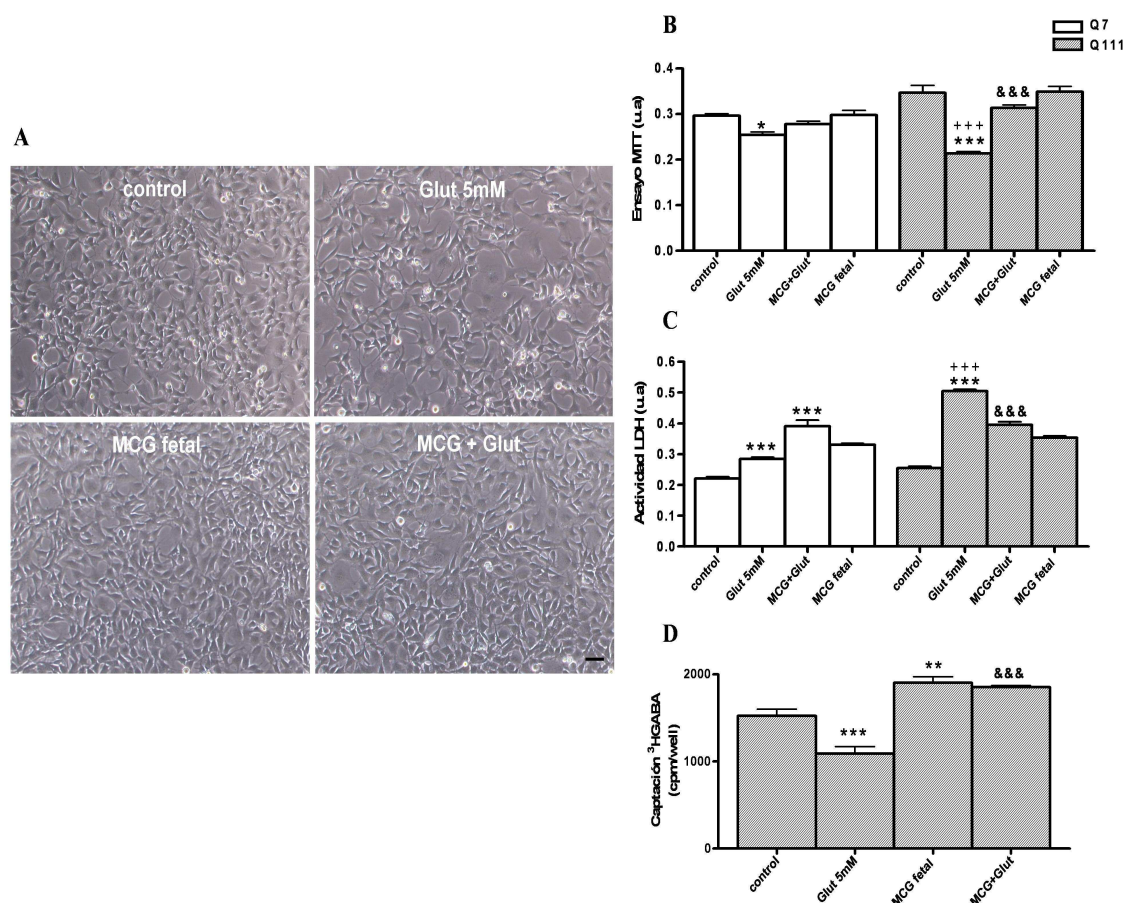


Figura 30. Efectos del MCG fetal y glutamato sódico en células Q111. A: Imágenes representativas en contraste de fases de las células Q111 tratadas con glutamato sódico (Glut) 5mM, MCG y MCG + Glut. El grupo control contiene un medio definido (DM). Las células se trataron a los 3 DIV durante 24 horas con Glut y MCG por separado y juntos. (Escala = 50 μm). **B:** Niveles de MTT. **C:** Necrosis medida por la actividad LDH. **D:** Captación de $^3\text{HGABA}$ en neuronas de cultivos primarios de mesencéfalo de ratones WT. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 5$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs grupo control. $+++p < 0.001$ Q111 vs Q7. $\&\&p < 0.001$ MCG + Glut vs Glut.

5.2.2. Neuroprotección y regeneración celular del MCG fetal frente a daño oxidativo y mitocondrial

- Efectos del MCG fetal frente al daño mitocondrial provocado por el ácido 3NP en células Q111.

Elegimos como modelo de toxicidad mitocondrial el inhibidor del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, el ácido 3NP a una dosis de 2.5 mM y tratamos las células durante 24 horas en medio definido y/o en presencia del MCG estriatal fetal.

Observamos que el 3NP aumentó la muerte por apoptosis en las células mutadas Q111 en medio definido (figura 31 A-D). El co-tratamiento con MCG fetal aumentó el número de células que expresan β -tubulin (figura 31 A-B) y disminuyó la muerte por apoptosis de las células Q111 inducida por el ácido 3NP. Es más, el porcentaje de células apoptóticas en el grupo MCG + 3NP fue menor que en el grupo control en medio definido (figura 31 C y D), lo que nos permitió comprobar un efecto protector frente a muerte celular del MCG estriatal fetal en las células Q111.

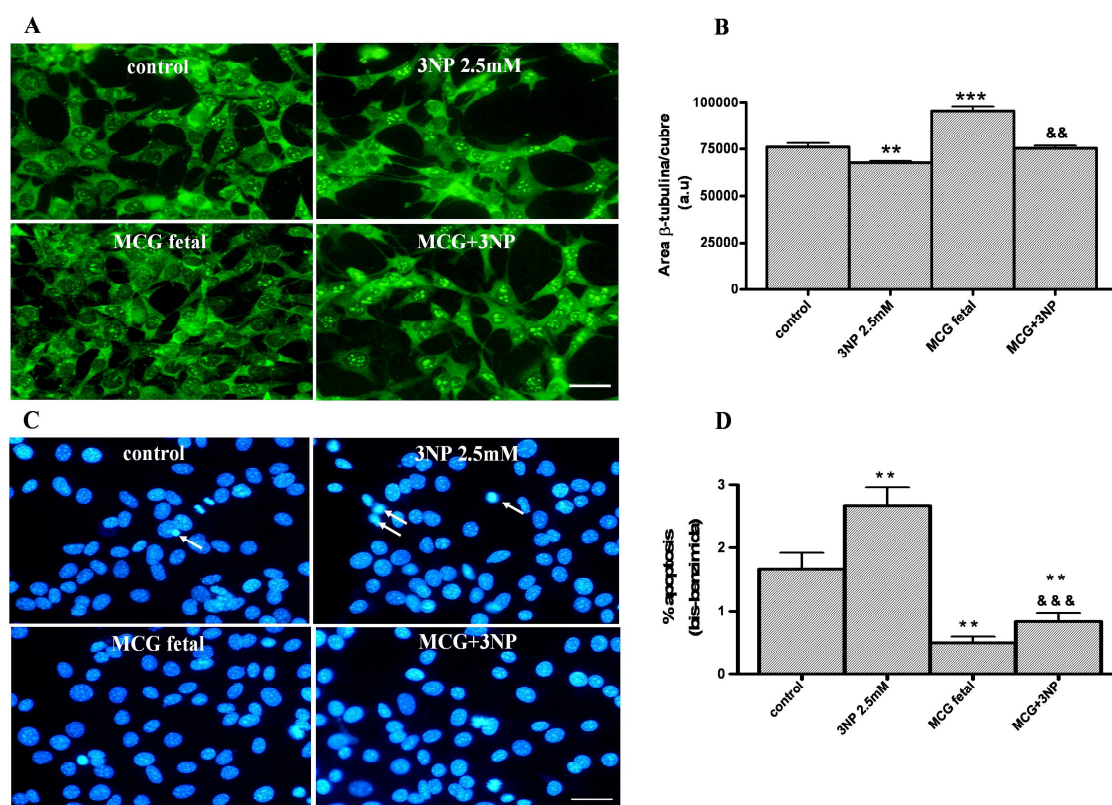


Figura 31. El MCG protege frente al daño mitocondrial provocado por el ácido 3NP en células Q111. **A:** Imágenes representativas de la tinción con β -tubulina del grupo control (MD), 3NP 2.5 mM, MCG fetal y MCG + 3NP. (Escala = 30 μ m) y **B:** su correspondiente cuantificación del número total de neuronas expresado en área de β -tubulina. **C:** Imágenes de tinción de núcleos totales con Hoeschst (bis-benzimida) de los cuatro grupos experimentales de células Q111. **D:** Porcentaje de núcleos con cromatina condensada y fragmentada para medir apoptosis en los cuatro grupos experimentales. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 4 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. ** p <0.01, *** p <0.001 *vs* grupo control. && p <0.01, &&& p <0.001 MCG + 3NP *vs* 3NP.

- Efectos del MCG fetal frente al daño provocado por H_2O_2 en células Q111

A continuación, elegimos el H_2O_2 como modelo de daño oxidativo. El tratamiento con H_2O_2 , 2 μ M, durante 24 horas provocó un descenso en el número total de células Q111, medido por la tinción celular con el anticuerpo β -tubulina. Sin embargo, en

presencia del MCG fetal, este efecto se vio revertido aumentando el número de células (figura 32 A y B). La muerte por apoptosis y necrosis se incrementó con H_2O_2 , pero el MCG fetal protege a las células Q111 de este efecto disminuyendo la muerte hasta los niveles control (figura 32 C-E). Debemos resaltar también que la necrosis medida por células trypan blue positivas disminuyó significativamente en los grupos tratados con MCG, y que el grupo MCG + H_2O_2 tuvo menos porcentaje de necrosis que el observado en el grupo control tratado con MD (figura 32 E).

En estas células, al ser tratadas con peróxido de hidrógeno, se produjo una elevada acumulación de radicales libres, ROS. Estos radicales fueron medidos gracias a la oxidación del compuesto fluorescente DCF, y la producción de ROS fue tiempo (figura 32 F y G) y dosis dependiente (figura 32 H). El co-tratamiento con MCG fetal reduce la producción de ROS provocada por el agua oxigenada (figura 32 I-J).

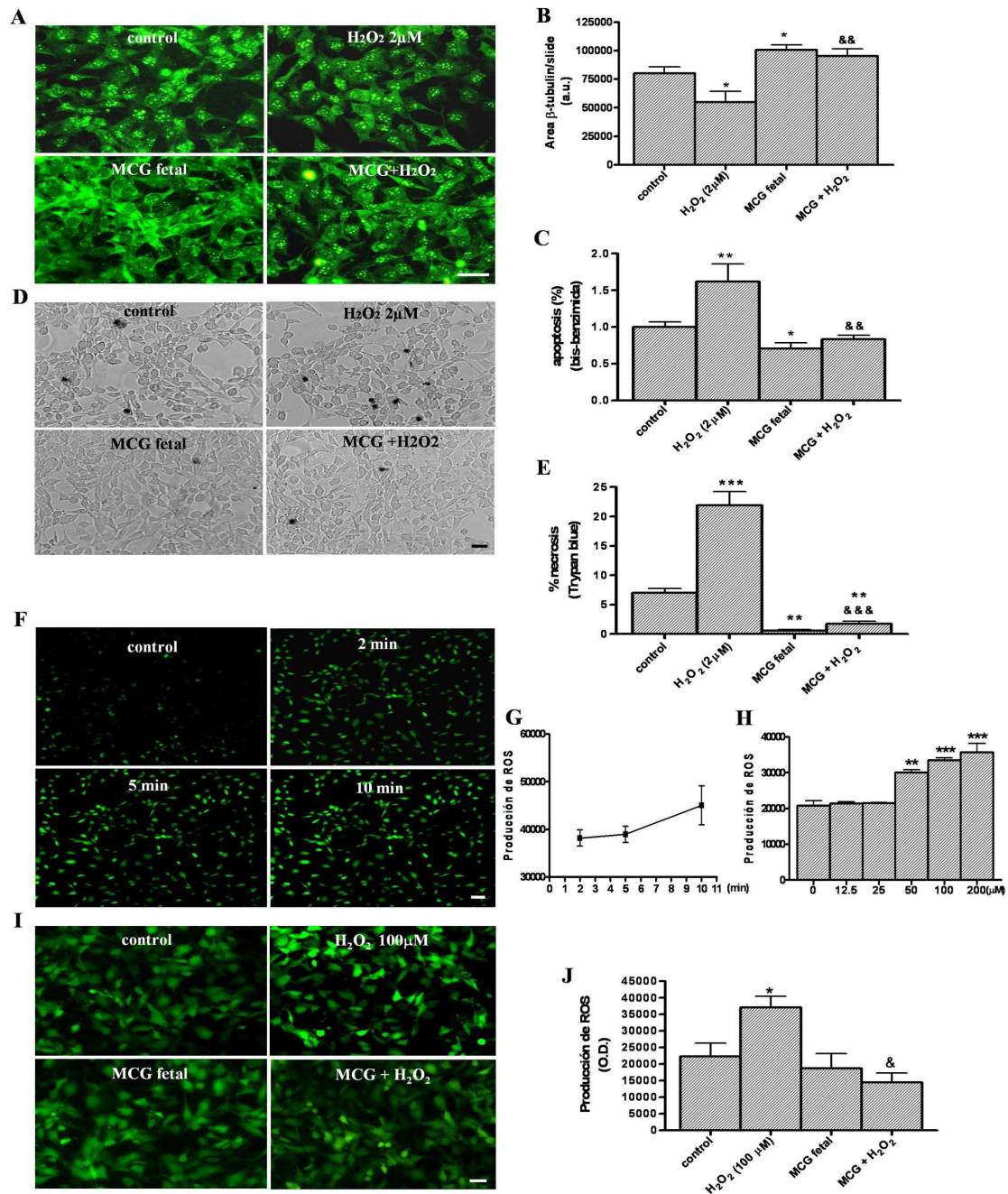


Figura 32. El MCG protege a las células Q111 de la muerte celular y de los radicales libres producidos por el H_2O_2 . **A:** Micrografías de las células Q111 tratadas con H_2O_2 (2 μM) a los 3 DIV durante 24 horas. Grupo control, H_2O_2 (2 μM), MCG fetal estriatal y MCG + H_2O_2 . **B:** y su correspondiente cuantificación del número total de neuronas expresado como el área total de la proteína β -tubulina. **C:** Porcentaje de apoptosis en los diferentes grupos experimentales. **D:** Imágenes de la muerte celular por la tinción de trypan blue. **E:** Porcentaje de células necróticas. **F:** Imágenes de fluorescencia producida por DCF en las células Q111. Generación de ROS tiempo-dependiente con la dosis de H_2O_2 , 100 μM a 2, 5 y 10 min. **G:** Cuantificación de ROS tiempo-dependiente medido con parámetros de excitación a 485 nm y emisión a 535 nm y expresado en unidades de densidad óptica (D.O.). **H:** Cuantificación de la producción de ROS dosis-dependiente por el H_2O_2 (12.5, 25, 50, 100 and 200 μM) durante 10 min y expresado en D.O. **I:** Imágenes de fluorescencia de las células Q111. El pre-tratamiento con MCG 30 min antes de añadir H_2O_2 100 μM durante

10 min, disminuye la generación de ROS. **J:** Cuantificación de la producción de ROS intracelular en los cuatro grupos experimentales. Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 4 muestras en cada grupo experimental). (Escala = 30 μ m). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *vs* su respective control . && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ MCG + H₂O₂ *vs* H₂O₂.

5.2.3. Caracterización molecular de los efectos del MCG. Mecanismos moleculares de neuroprotección

Patrón de bandas del medio definido y el medio condicionado de glia

Para poder estudiar los mecanismos implicados en la neuroprotección del MCG frente a la muerte celular inducida por H₂O₂, estudiamos el perfil proteico tanto en el medio definido (MD) como en el MCG estriatal fetal. La electroforesis realizada con el MCG y el MD, nos muestra la presencia de siete bandas en el MCG que no aparecen en el patrón de bandas del MD. Estas bandas tienen pesos relativos de 250, 123, 38, 36, 33, 29 y 12 KDa (figura 33 A).

Radicales libres

Los niveles de GSH fueron más elevados en el MCG con respecto al MD (figura 33 B). El tratamiento con H₂O₂, 2 μ M, disminuyó los niveles intracelulares de GSH y el co-tratamiento con MCG fetal aumentó estos niveles incluso por encima de los niveles del control (figura 33 C).

Proteínas apoptóticas

El corte de la proteína PARP por caspasas es un marcador de apoptosis (Tong et al., 2001). Hemos observado cómo el agua oxigenada promueve la apoptosis mediada por caspasas produciendo la acumulación de este fragmento cortado de PARP y cómo el MCG fetal previene frente a este efecto. El H₂O₂, 2 μ M x 24h, triplica el ratio PARP cortada/completa, indicando apoptosis, en las células Q111, y el co-tratamiento con MCG fetal consigue disminuir este efecto (figura 33 D).

Chaperonas

La chaperona Hsp70 aumentó sus niveles tras el tratamiento con H₂O₂, 2 μ M x 24h y estos niveles disminuyeron al tratar el cultivo con MCG fetal (figura 33 E).

Proteínas poliubiquitinadas

El H_2O_2 , $2\mu M$ durante 24 horas induce la acumulación de proteínas poliubiquitinadas en las células mutadas Q111. El co-tratamiento con MCG fetal previene la poliubiquitinización (figura 33 F y G).

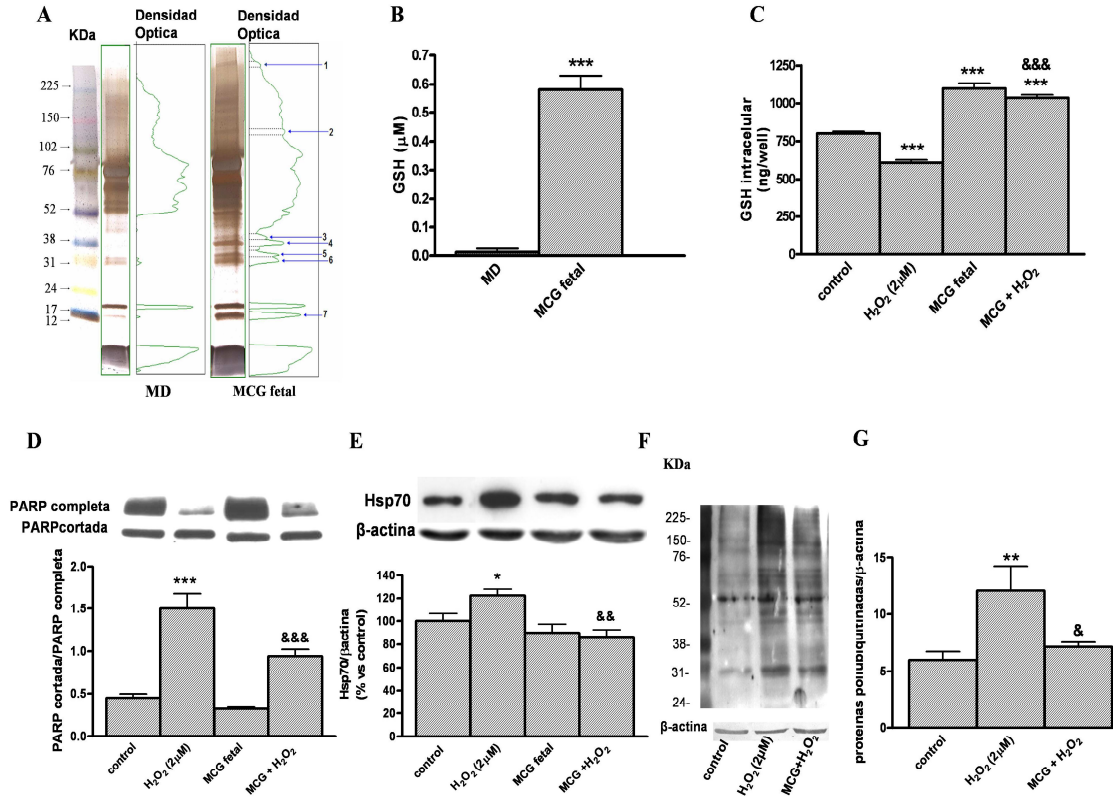


Figura 33. Mecanismos de neuroprotección del MCG fetal en células Q111. **A:** Patrón de bandas de proteínas del DM y MCG. Electroforesis en gel del medio definido (DM) y medio condicionado de glía fetal (MCG) y sus correspondientes medidas densitométricas. Los números 1 al 7 (250, 123, 38, 36, 33, 29 y 12 KDa respectivamente) en el panel de la derecha, indican siete bandas y las más mayoritarias sólo presentes en el MCG. **B:** Niveles de glutatión en DM y MCG. **C:** Niveles intracelulares de glutatión en células Q111 tratadas con H_2O_2 ($2\mu M$) y MCG. **D:** Expresión de las formas activadas, completa y cortada, de la proteína de muerte PARP. **E:** Expresión de la chaperona Hsp70. **F:** El MCG fetal striatal protege de la ubiquitinización de proteínas provocada por el H_2O_2 en las células Q111 y **G:** su correspondiente análisis densitométrico. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 4$ muestras en cada grupo experimental). (Escala = $30\mu m$). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ *vs* su respectivo control. $\&p < 0.05$, $\&\&p < 0.01$, $\&\&\&p < 0.001$ MCG + H_2O_2 *vs* H_2O_2 .

5.2.4. Efectos del MCG estriatal postnatal de 13 días y 2 meses frente al daño oxidativo y mitocondrial en células Q111

Hemos investigado si el MCG estriatal postnatal tiene el mismo efecto neuroprotector que el MCG embrionario en el modelo de toxicidad de daño oxidativo con H_2O_2 (figura 34). El MCG postnatal tanto de 13 días como de 2 meses, previene la pérdida del número de neuronas provocada por el H_2O_2 y también disminuye el porcentaje de apoptosis provocado por este tóxico en células Q111. Es más, los grupos tratados conjuntamente con MCG+ H_2O_2 disminuyeron el porcentaje de apoptosis e incrementaron el número de células con respecto al grupo control (figura 34 A-H).

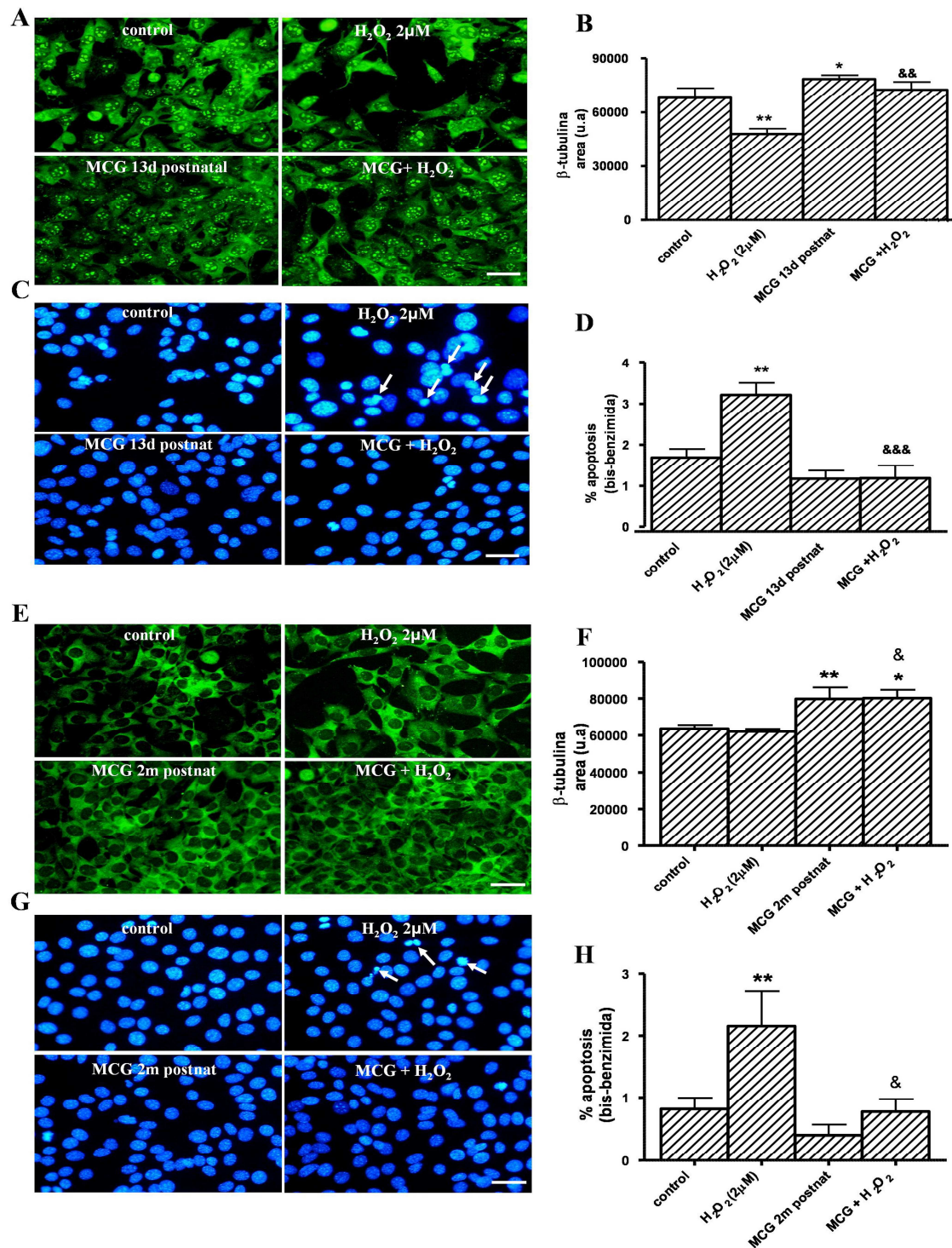


Figura 34. El MCG postnatal de 13 días y de 2 meses protege las células Q111 del daño producido por el H₂O₂. **A:** Imagen representativa de células tratadas con medio definido, H₂O₂ (2 μM), y MCG estriatal postnatal de 13 días durante 24 horas a 3 DIV (escala = 30 μm) y **B:** su correspondiente cuantificación del número total de neuronas expresado como el área de β-tubulina. **C:** Imagen representativa del número total de núcleos teñidos con bis-benzimida de los cuatro grupos experimentales. Las flechas indican células apoptóticas. **D:** Porcentaje de cromatina condensada y fragmentada (células en apoptosis). **E:** Imagen representativa de células tratadas con medio definido, H₂O₂ (2 μM), y MCG estriatal postnatal de 2 meses durante 24 horas a 3 DIV (escala = 30 μm) y **F:** su correspondiente cuantificación del número total de neuronas expresado como el área de β-tubulina. **G:** Imagen representativa del número total de núcleos

teñidos con bis-benzimida de los cuatro grupos experimentales. Las flechas indican células apoptóticas. **H:** Porcentaje de apoptosis. Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 4$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *vs* grupo control. && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$ MCG + H₂O₂ *vs* H₂O₂.

5.3. Estudio comparativo entre factores de crecimiento y MCG fetal

Como se ha comentado en la introducción, el MCG posee una serie de factores de crecimiento además de potentes antioxidantes. Por ello, quisimos comprobar el efecto neuroprotector de algunos de esos factores de crecimiento por separado sobre las células Q111 tratadas con peróxido de hidrógeno y luego comparar el efecto con el del MCG. Las dosis utilizadas de los factores de crecimiento se escogieron basándonos en experimentos previos en el laboratorio (Mena et al., 1997; Mena et al., 1995).

5.3.1. Efectos del bFGF en células Q111 comparado con el MCG

Hemos estudiado el efecto del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) a diferentes dosis (10 y 20 ng/ml) para probar su efecto en las células mutantes para huntingtina Q111 (figura 35). No observamos cambios en el número total de células expresado como el área de β -tubulina entre células tratadas con bFGF y las controles en medio definido, sin embargo, con el MCG fetal observamos un aumento significativo en el número de células (β -tubulina positivas) Q111 (figura 35 A y B). Ambas dosis de bFGF disminuyen el porcentaje de apoptosis (figura 35 C y D) y aumentan la diferenciación celular, medida como el número de células multiproceso (células con más de tres ramificaciones) (figura 35 E y F). Sin embargo, los efectos del MCG estriatal fetal son aún más pronunciados que con el bFGF en todos los parámetros estudiados.

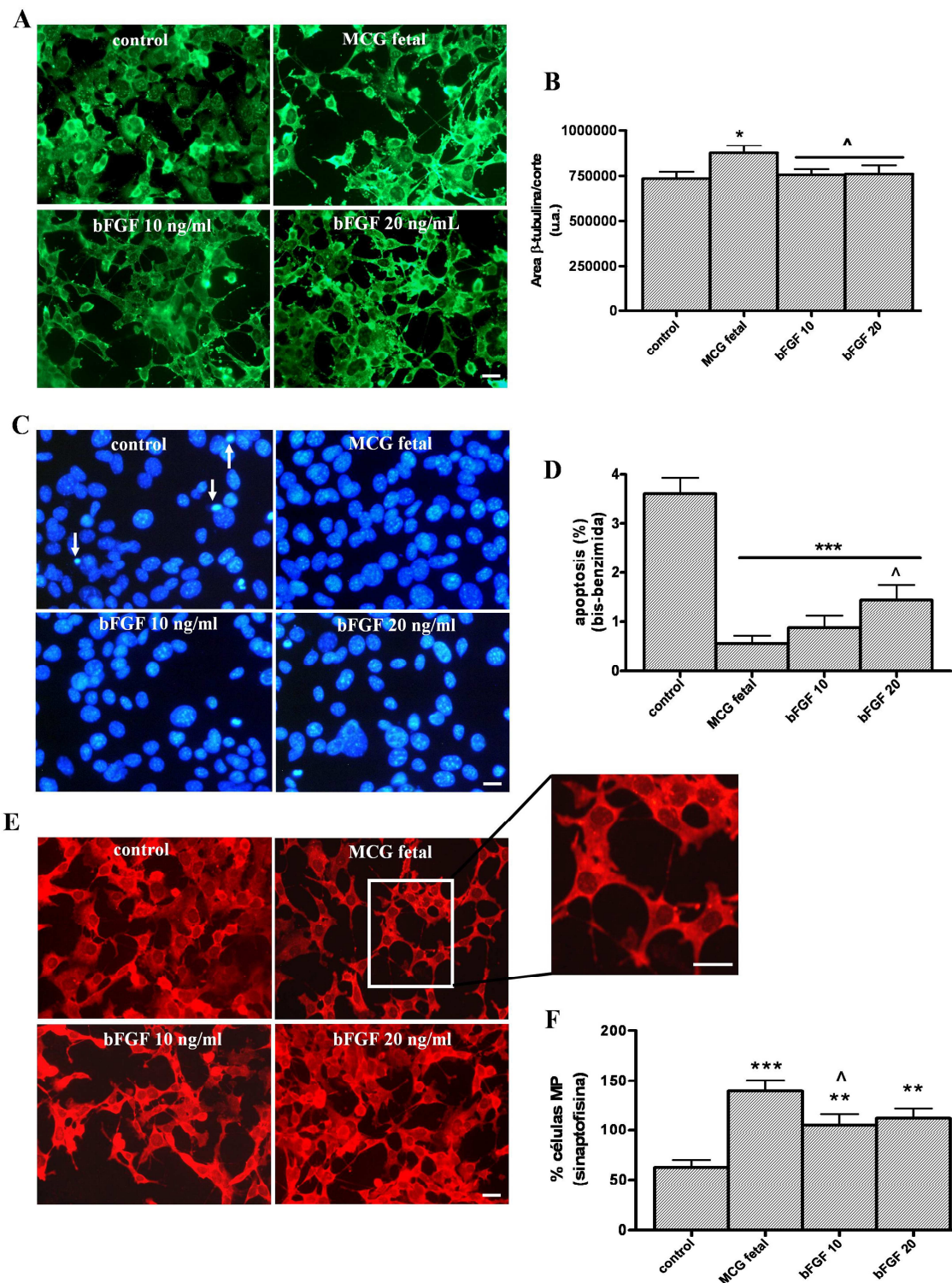


Figura 35. Efectos del factor de crecimiento bFGF y el MCG fetal en células Q111. **A:** Imágenes representativas de células (β -tubulina +) Q111 tratadas con medio definido, MCG fetal, bFGF (10 ng/ml) y bFGF (20 ng/ml) durante 24 horas a 3 DIV. Escala = 30 μ m. **B:** Número total de neuronas expresado como el área total de β -tubulina. **C:** Imágenes representativas del número total de núcleos teñidos con bis-benzimida (escala = 30 μ m). Las flechas indican células apoptóticas. **D:** Porcentaje de células apoptóticas en los diferentes grupos experimentales. **E:** Imágenes representativas de tinción con sinaptofisina (escala = 30 μ m) con imagen aumentada del grupo tratado con MCG. **F:** Porcentaje de células diferenciadas con más de tres ramificaciones

(células multiproceso: MP). Los valores están expresados como la media \pm SEM (n = 4 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$ *vs* grupo control. ^ $p < 0.05$ bFGF *vs* MCG fetal.

5.3.2. Efectos del GDNF en células Q111 comparado con el MCG

Otro de los factores de crecimiento que probamos fue el factor de crecimiento derivado de glia (GDNF), en las células mutadas Q111. Usamos dos dosis (50 y 100 ng/ml) y comparamos los efectos del GDNF con los producidos por el MCG. El número total de células expresado como el área de β -tubulina fue similar entre los grupos tratados con GDNF y el grupo control, pero aumentó con el MCG (figura 36 A y B). El porcentaje de apoptosis disminuyó significativamente con el GDNF y bastante más con el MCG (figura 36 C y D). GDNF 100 ng/ml y el MCG fetal aumentan el número de células multiproceso diferenciadas comparado con el grupo control (figura 36 E y F), pero en este caso podemos asegurar que el MCG tiene un efecto protector más potente que el GDNF.

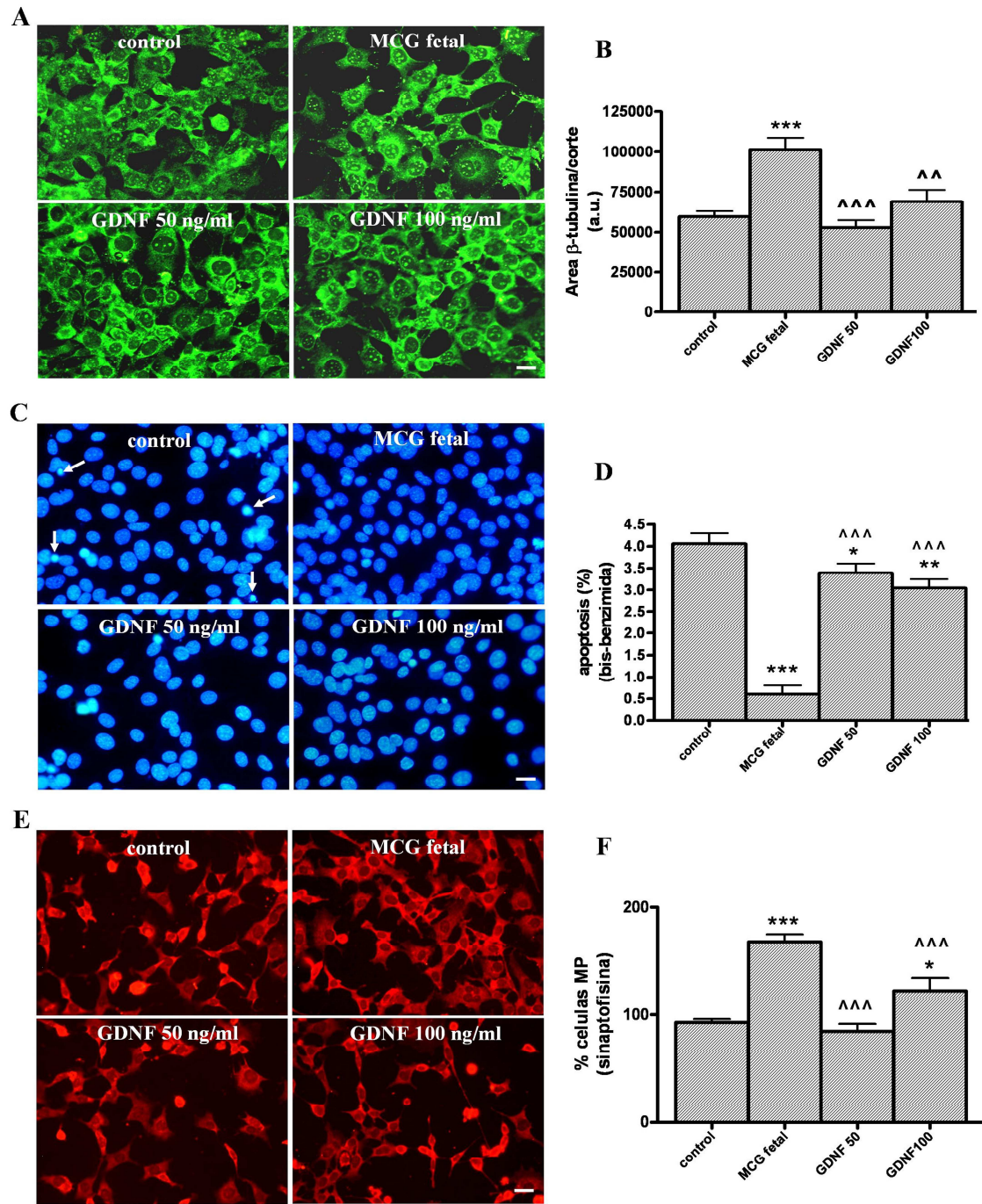


Figura 36. Efectos del factor de crecimiento GDNF y el MCG fetal en células Q111. **A:** Imágenes representativas de células (β -tubulina +) Q111 tratadas con medio definido, MCG fetal, GDNF (50 ng/ml) y GDNF (100 ng/ml) durante 24 horas a 3 DIV (escala = 30 μ m). **B:** Cuantificación del número total de neuronas expresado como el área total de β -tubulina. **C:** Imágenes representativas del número total de núcleos teñidos con bis-benzimida de los cuatro grupos experimentales (escala = 30 μ m). **D:** Porcentaje de cromatina condensada y núcleos fragmentados expresando apoptosis. **E:** Imágenes representativas de tinción con sinaptofisina (escala = 30 μ m). **F:** Porcentaje de células diferenciadas con más de tres ramificaciones (células multiproceso: MP). Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 4$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *vs* grupo control. ^^^ $p < 0.001$ GDNF *vs* MCG fetal.

5.3.3. Efectos del BDNF en células Q111 comparado con MCG

El factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) fue el tercer factor de crecimiento que probamos a unas dosis de 50 y 100 ng/ml. En este caso, el BDNF tampoco aumentó el número de células comparado con el grupo control, mientras que sí lo hizo el MCG (figura 37 A y B). BDNF 100 ng/ml y el MCG fetal disminuyeron significativamente el porcentaje de apoptosis (figura 37 C y D) y se produjo un aumento en el número de células diferenciadas comparado con el grupo control (figura 37 E y F). El MCG fetal de nuevo tuvo efectos más beneficiosos para las células que el BDNF.

5.3.4. Efecto de los factores de crecimiento y el MCG sobre la toxicidad inducida por H₂O₂ en células Q111

Después de testar los diferentes factores de crecimiento y ver sus efectos en las células Q111, quisimos ver su efecto sobre la toxicidad inducida por el H₂O₂ y comparar los efectos con respecto a los del MCG fetal. Pudimos observar que el número total de células medido por el área de β -tubulina, se recuperó con los factores de crecimiento pero sobretodo y más significativamente con el MCG (figura 38 A y B). El porcentaje de apoptosis también disminuyó significativamente con los factores de crecimiento y el MCG fetal (figura 38 C) y sin embargo, el número de células multiproceso disminuyó con el tratamiento con H₂O₂ y este efecto solo se recuperó con el MCG fetal (figura 38 D y E).

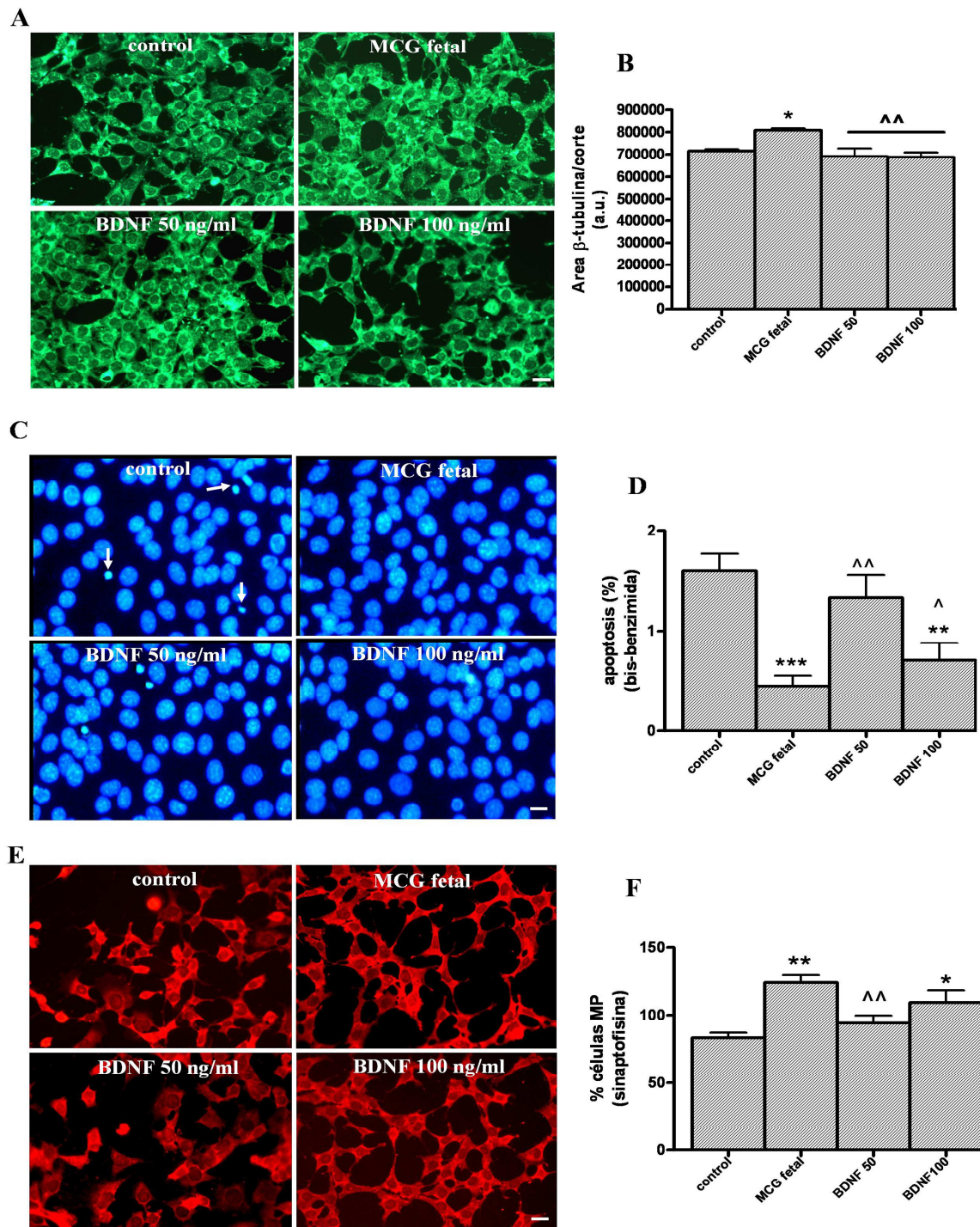


Figura 37. Efectos del factor de crecimiento BDNF y el MCG fetal en células Q111. **A:** Imágenes representativas de células Q111 tratadas con medio definido, MCG fetal, BDNF (50 ng/ml) y BDNF (100 ng/ml) de los cuatro grupos experimentales durante 24 horas a 3 DIV (escala = 30 μ m) y **B:** su correspondiente cuantificación del número total de neuronas expresado como el área total de β -tubulina. **C:** Imágenes representativas del número total de núcleos teñidos con bis-benzimida de los cuatro grupos experimentales (escala = 30 μ m). **D:** Porcentaje de cromatina condensada y núcleos fragmentados expresando apoptosis. **E:** Imágenes representativas de tinción con sinaptofisina (escala = 30 μ m). **F:** Porcentaje de células diferenciadas con más de tres ramificaciones (células multiproceso MP). Los valores están expresados como la media \pm SEM ($n = 4$ muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una

ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *vs* grupo control. ^^^ $p < 0.001$ BDNF *vs* MCG fetal.

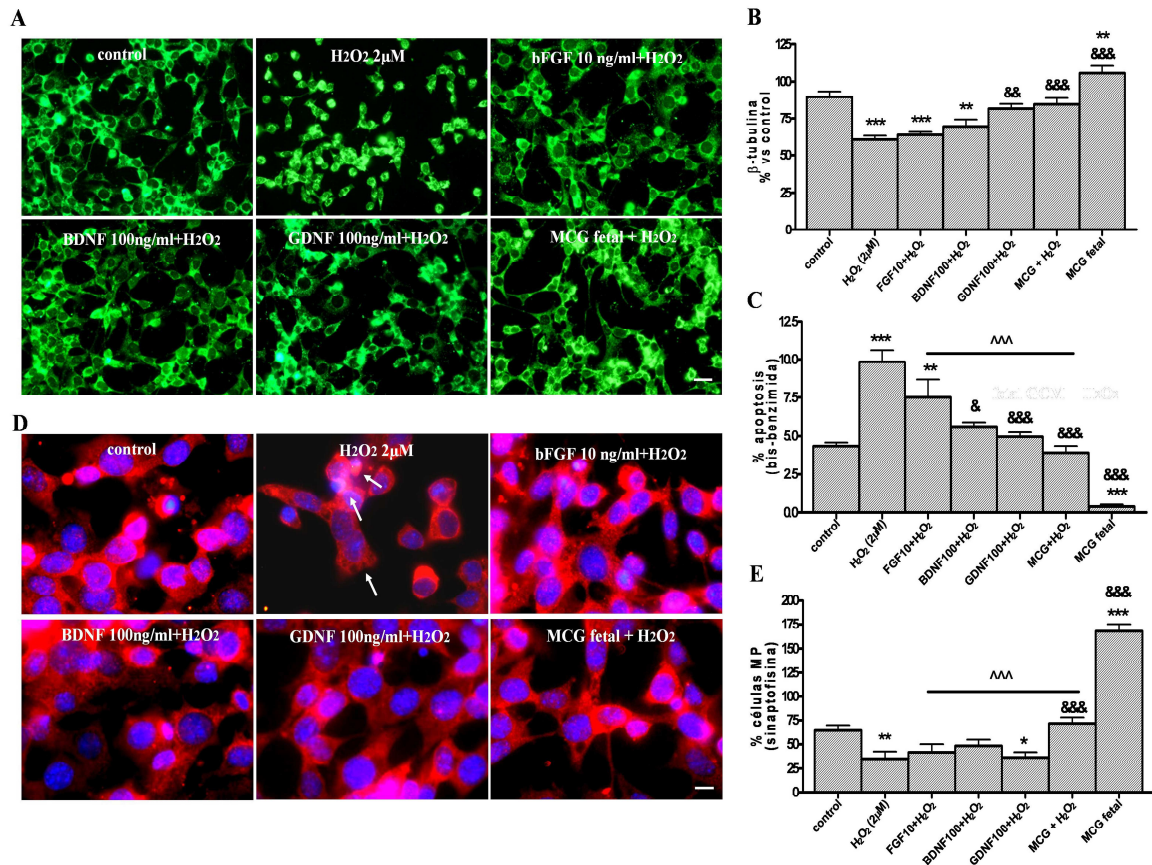


Figura 38. Comparación de efectos neuroprotectores entre bFGF, GDNF, BDNF y MCG fetal frente a la toxicidad inducida por H₂O₂ en células Q111. A: Imágenes representativas del tratamiento de células Q111 con medio definido, H₂O₂ (2 μM), bFGF 10 ng/ml + H₂O₂, BDNF 50 ng/ml + H₂O₂, GDNF 50 ng/ml + H₂O₂, MCG + H₂O₂ de los cuatro grupos experimentales durante 24 horas a 3 DIV (escala = 30 μm). **B:** Número total de neuronas expresado como área total de β-tubulina. **C:** Porcentaje de apoptosis en los diferentes grupos experimentales. **D:** Imágenes representativas de la co-tinción con sinaptofisina (rojo) y con Hoechst (azul) (escala = 15 μm). **E:** Porcentaje de células multiproceso: MP, células con más de tres ramificaciones (diferenciadas). Los valores están expresados como la media ± SEM (n = 6 muestras en cada grupo experimental). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido del test “Newman-Keuls”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *vs* grupo control. & $p < 0.05$, && $p < 0.01$, &&& $p < 0.001$, ^^^ $p < 0.001$ factores de crecimiento *vs* MCG fetal.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis, es el de intentar aportar algo de conocimiento al descubrimiento de posibles mecanismos de neuroprotección en la enfermedad de Huntington. Conocemos la patología y qué mecanismos moleculares se ven afectados, pero no sabemos cuál de ellos es el primero, el que desencadena todos los demás, o si suceden varios simultáneamente. Así que, si pudiéramos mejorar la calidad de vida de los pacientes o retrasar la aparición de los síntomas sería un gran logro. Este trabajo intenta ayudar a conseguir este fin.

Estudios previos de nuestro laboratorio, demuestran que la supresión parcial de parkina en ratones con patología de Alzheimer (APP) disminuye la patología de la enfermedad (Perucho et al., 2009), sin embargo, la supresión total de parkina agrava el fenotipo de otros ratones con patología tau (Rodríguez-Navarro et al., 2008). Por ello, y para comprobar este efecto en la enfermedad de Huntington, decidimos crear un doble mutante portador de la enfermedad y carente de una copia de parkina, el ratón R6/1/PK^{+/-}. Hemos observado que la supresión parcial de la proteína parkina en ratones mutantes R6/1, empeoró la patología característica de los ratones R6/1, mostrando así la importancia de la parkina, proteína relacionada con la ubiquitinación y degradación de proteínas anómalas, en la enfermedad de Huntington. A continuación decidimos probar otra posible forma de proteger a los ratones frente a la enfermedad, suministrándoles una dieta rica en ácidos grasos, rica en aceite de oliva virgen extra, potente antioxidante, y pudimos ver una ligera mejoría en la conducta y una tendencia no significativa a la disminución de agregados de huntingtina en el estriado e hipocampo. A continuación, comenzamos a trabajar en un modelo celular de la enfermedad, con células estriatales de ratón control y mutadas STHdH^{Q7/Q7} y STHdH^{Q111/Q111} respectivamente. En estas células hemos investigado el efecto del fármaco estabilizador de dopamina (-)-OSU6162 y un medio secretado por las células de la glía (MCG) para observar sus mecanismos de acción y neuroprotección, principalmente frente a estrés oxidativo y daño mitocondrial. Hemos observado protección por parte de ambos en el daño mitocondrial, estrés oxidativo y daño provocado con el tratamiento con glutamato sódico.

1. Supresión parcial de parkina en ratones R6/1

Hemos estudiado el efecto que supondría la reducción de la actividad del proteasoma mediante la anulación parcial de la proteína parkina, una E3-ubiquitin ligasa, en los ratones R6/1. Una de las hipótesis de la patología de la enfermedad es que los

agregados de huntingtina no pueden ser eliminados por la maquinaria de degradación de proteínas y producen la muerte neuronal. La parkina es una proteína con capacidad ubiquitin-ligasa y juega un papel muy importante en muchos otros procesos celulares importantes y en la estabilidad de las proteínas (Ciechanover, 2003; Giasson and Lee, 2003; Kitada et al., 1998).

Nuestros estudios muestran cómo la supresión parcial de parkina da lugar a un empeoramiento en déficits motores y en comportamiento y un aumento de la apoptosis en el estriado. Los ratones R6/1 y R6/1/PK^{+/-}, tienen daños similares en las neuronas dopaminérgicas, descenso en los niveles de monoaminas, y en los niveles de chaperonas. El doble mutante R6/1/PK^{+/-} tiene menos inclusiones de huntingtina en el estriado con respecto a los R6/1 y mayores niveles de la proteína LC-3 II (marcador de autofagia) pero, sin embargo, no existen diferencias en el número de neuronas DARPP-32 positivas entre ambos ratones. Estos datos sugieren que el daño parcial del sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) debido a la supresión parcial de parkina, parece agravar los déficits observados en los ratones R6/1 y, por lo tanto, este daño en el UPS podría ser importante en la patogénesis de la EH. Los mecanismos celulares de prevención frente a la agregación de proteínas incluyen el aumento de la producción de chaperonas y la autofagia (Paul, 2007). Los niveles de chaperonas no fueron diferentes entre ambos ratones.

La alteración del UPS en pacientes con Huntington ya ha sido descrita y también en modelos celulares y en un modelo de ratón después de la transfección viral de huntingtina mutada (Bennett et al., 2007; Hunter et al., 2007; Wang et al., 2008). Existe una gran controversia acerca del papel que juega el UPS en la enfermedad de Huntington. Algunos estudios in vitro sugieren la posibilidad de que las cadenas de poliglutaminas o la agregación de péptidos no pueden ser digeridos por el UPS, provocando un mal funcionamiento de éste (Venkatraman et al., 2004). Sin embargo, en otros estudios se ha podido comprobar que las proteínas solubles con cadenas del poliQ, no producen daño en la actividad proteosomal (Michalik and Van Broeckhoven, 2004) y se demuestra cómo estas proteínas son completamente degradadas por el UPS. Estudios in vivo en cerebros de ratón R6/2 no han detectado una pérdida de función del UPS (Bett et al., 2006), pero otros trabajos posteriores donde se mide la actividad del UPS, demuestran que ésta se ve reducida, al igual que los niveles de ATP, en la sinapsis neuronal (Wang et al., 2008).

Quizás la evidencia más convincente para apoyar la idea de la patogenicidad de la supresión de parkina en ratones mutantes para la enfermedad de Huntington, es el hecho de que en estos animales la apoptosis, medida como el número de células TUNEL positivas y los niveles del cociente de proteínas pro-antiapoptóticas Bax/Bcl2, está

aumentada con respecto a los ratones WT. La diferencia es estadísticamente significativa con respecto a los demás grupos en el estriado y con respecto a ratones WT y PK^{+/-} en el hipocampo. El nivel de apoptosis no se correlaciona con el número de inclusiones de huntingtina, ya que los ratones R6/1/PK^{+/-} tienen menos agregados en el estriado y no hay diferencias con los R6/1 en el hipocampo. Estos niveles elevados de apoptosis en el estriado de los ratones dobles mutantes, no se correlaciona con una mayor pérdida de neuronas estriatales, marcadas bien con un marcador no selectivo de neuronas estriatales como es el NeuN o con un marcador muy específico de este tipo de neuronas como es el DARPP-32. En el primer caso, la no correlación puede deberse a la contracción o disminución del tamaño del estriado en ambos ratones mutantes. Con respecto al DARPP-32, en trabajos previos en nuestro laboratorio (Rodríguez-Navarro et al., 2008), no se observan cambios de esta proteína en ratones knock-out para parkina y se aprecia una gran disminución de los niveles de DARPP-32 en ratones dobles mutantes PK^{-/-}/Tau^{VLW}. Estos ratones tiene anulada totalmente la expresión de parkina, pero ambas patologías, tanto tau como huntingtina, se agravan con la pérdida parcial o total de esta ubiquitin-E3 ligasa, demostrando su importancia.

Estudios recientes demuestran que en modelos de Huntington no existe alteración en la conversión de la proteína LC3-I en LC3-II, sugiriendo que la función autofágica en cerebro no está particularmente afectada por la expresión de huntingtina mutada (Li et al., 2010). Sin embargo, nosotros hemos observado un aumento en los niveles del ratio LC3-II/LC3-I estadísticamente significativo en ratones R6/1/PK^{+/-}, sugiriendo la posibilidad de un aumento en los mecanismos de compensación por la falta de parkina en la degradación de proteínas.

2. Efectos de una dieta rica en aceite de oliva en ratones R6/1 y WT

El siguiente estudio que diseñamos fue el de comprobar si suministrando una dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra a los ratones R6/1, conseguíamos mejorar o retrasar los síntomas de la enfermedad. Para ello diseñamos dos experimentos. El primero se realizó solo con ratones R6/1 sintomáticos, a partir de los 5 meses hasta los 7 meses de edad. El segundo experimento comenzó a los dos meses de edad, cuando los ratones aún no habían desarrollado síntomas, y se realizó con ratones WT y R6/1 hasta los 7 meses de edad.

La dieta mediterránea, donde aparece como elemento básico el aceite de oliva virgen extra, está asociada a una baja incidencia de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer (Cicerale et

al., 2010). Los beneficios para la salud del aceite de oliva proceden de su alto contenido en ácido oleico y microconstituyentes como los compuestos fenólicos (Quiles et al., 2004; Tasset et al., 2011). Estos cuerpos fenólicos poseen un potente efecto antiinflamatorio y antioxidante, incluyendo el oleocantal, descubierto recientemente, que posee actividad antiinflamatoria similar al ibuprofeno (Lucas et al., 2011), y el hidroxitirosol (HT) que tiene una elevada capacidad antioxidante en estudios con un modelo inducido de la enfermedad de Huntington con 3NP en ratas (Tasset et al., 2011).

En el primer grupo de experimentos, los ratones R6/1 sintomáticos tomaron una dieta rica en ácidos grasos basada en aceite de oliva virgen extra durante dos meses, y pudimos comprobar que perdían peso pero no de una manera tan acusada como los ratones con dieta normal, y existía una mejora en la longitud de la zancada en los ratones que tomaron el aceite de oliva. Los agregados de huntingtina en estriado disminuyeron con la dieta y se observó una reducción en el porcentaje de apoptosis medida por las células TUNEL⁺. El aceite como suplemento alimenticio aumentó los niveles de TH en sustancia nigra pero no produjo cambios en los niveles de DARPP-32 ni en la chaperona Hsp70.

Los cuerpos cetónicos son una fuente alternativa de acetyl-coenzima A para el ciclo de Krebs, y se produce ATP de manera más eficiente que a partir del piruvato. Estudios publicados recientemente con dietas cetogénicas en ratones R6/2, apoyan nuestros resultados al no encontrar cambios significativos a nivel motor con la dieta cetogénica pero sí un retraso en la pérdida de peso de los ratones (Ruskin et al., 2011) quizá debido a un mayor aporte de ATP.

El segundo experimento con ratones WT y R6/1 comenzó a los dos meses de edad, cuando los R6/1 aún no han desarrollado síntomas motores y estuvieron 5 meses tomando la dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra. Observamos el mismo efecto en el peso que en el anterior experimento, desde el inicio de la dieta engordan más que los ratones sin dieta suplementada y también se observa una ligera mejora en la longitud de la zancada. Los ratones con dieta rica en ácidos grasos tienen menos inclusiones de huntingtina en el estriado y tienen aumentados los niveles del ratio Bcl2/Bax, indicador de supervivencia celular.

Estudios previos han demostrado que las dietas cetogénicas, dietas basadas en un elevado aporte de grasas como fuente de energía, mejoran enfermedades como el Alzheimer, la epilepsia, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Henderson, 2008; Vanitallie et al., 2005; Zhao et al., 2006). Por tanto, podríamos concluir que la dieta rica en aceite de oliva virgen extra no produce efectos negativos en los ratones R6/1 modelo de la enfermedad de Huntington y mejora ciertos parámetros

característicos de la enfermedad, sobretodo los relacionados con el sistema dopaminérgico nigroestriatal, pudiendo significar el inicio de una posible terapia para la enfermedad de Huntington.

3. Efecto neuroprotector del fármaco (-)-OSU6162 en un modelo celular de la enfermedad de Huntington

El fármaco (-)-OSU6162 pertenece a los denominados estabilizadores dopaminérgicos y es un análogo de la pridopidina o ACR16, que es el primer fármaco que ha demostrado poseer un efecto beneficioso global sobre los trastornos motores en la enfermedad de Huntington (de Yebenes et al., 2011). Los estabilizadores dopaminérgicos representan una nueva clase de fármacos del SNC y son ligandos activos dopaminérgicos. La primera acción *in vivo* de estos compuestos es la de estimular, suprimir o no causar efecto alguno en la actividad motora, dependiendo del tono dopaminérgico (Carlsson et al., 2004). En modelos animales donde existe hipo o hiperactividad dopaminérgica, se ha visto la eficacia de estos fármacos, modulando la actividad dopaminérgica, incluyendo modelos animales de esquizofrenia, disquinesias y distonias inducidas por L-DOPA de la enfermedad de Parkinson y complicaciones motoras de la enfermedad de Huntington con estados emocionales positivos (Dyhring et al., 2009; Nilsson et al., 2004; Rung et al., 2008; Tedroff et al., 1999). Los estabilizadores dopaminérgicos incluyen agonistas parciales de dopamina como el aripiprazol que actúa como antagonista del receptor D₂ postsináptico y como agonista de receptores dopaminérgicos D₂ presinápticos. Sin embargo, los fármacos pridopidina ACR16 y (-)-OSU6162 tienen un mecanismo de acción diferente al aripiprazol (Pettersson et al., 2010; Sonesson et al., 1994). Estos potenciales antipsicóticos son antagonistas puros del receptor D₂ de dopamina, con preferencia por autoreceptores presinápticos y con baja afinidad por receptores postsinápticos (Svensson et al., 1986) y también ejerce su efecto mediante los receptores 5-HT_{2A} (Burstein et al., 2011; Carlsson et al., 2011).

Estudios previos han sugerido que la neurotransmisión de glutamato y dopamina están afectados en la enfermedad de Huntington, siendo los mecanismos por los cuales la dopamina modula la excitación inducida por glutamato en ganglios basales y cortex los que pueden estar dañados (Andre et al., 2010). Se ha demostrado que los estabilizadores dopaminérgicos tienen efectos beneficiosos en la enfermedad de Huntington (Tedorff et al., 1999). Estudios recientes sugieren que, además de los efectos beneficiosos a nivel sintomático de estos fármacos, pueden modificar determinadas propiedades de la enfermedad. El estudio MermaiID, un ensayo clínico en fase III realizado en Europa con

más de 400 pacientes donde los pacientes toman una dosis de 90 mg/día de prídopidina durante 26 semanas, mejoran, en términos clínicos, las escalas durante el periodo de observación del estudio, mientras que en pacientes tratados con placebo o 45 mg/día de prídopidina, continúan con la inestabilidad motora. Por lo tanto, este estudio propone que, 90 mg/día de prídopidina, frena o retrasa la progresión de la enfermedad durante el tiempo de observación (de Yebenes et al., 2011).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, decidimos probar el fármaco (-)-OSU6162 en las células estriales Q7 y Q111 para ver qué mecanismos están afectados y las posibles vías de protección en la enfermedad. Planteamos por tanto la hipótesis de que el efecto neuroprotector del (-)-OSU6162 podría estar mediado o ser independiente de la transmisión sináptica. Con respecto al mecanismo sináptico, estudiamos los efectos del fármaco sobre la toxicidad inducida por glutamato exógeno y pudimos ver que el (-)-OSU6162 no conseguía mejorar el daño provocado por el glutamato, sugiriéndonos que este fármaco no tiene propiedades bloqueantes del receptor de glutamato. Esto, sin embargo, no excluye otras posibles interacciones del (-)-OSU6162 y la transmisión glutamatérgica cortico-estriatal, que no puede ser estudiada en un modelo aislado de estriado como son estas células.

También hemos estudiado el efecto de la interacción del (-)-OSU6162 con la función dopaminérgica. Como las células estriales no tienen una captación o liberación de DA significativa, decidimos investigar esta interacción en células E13 de mesencéfalo, enriquecidas en neuronas dopaminérgicas. Pudimos ver que el fármaco aumenta la captación de DA de alta afinidad en estas células E13 pero no aumenta la liberación del neurotransmisor dependiente de K^+ . En cambio, la inducción por anfetamina, produce un aumento en la liberación de DA en combinación con el (-)-OSU6162. La liberación de DA espontánea o aumentada por la concentración de K^+ , se produce en vesículas sinápticas mientras que el pool de DA liberada por anfetamina se considera que es DA recién sintetizada y es almacenada en el citoplasma. Este segundo pool de DA se metaboliza por la enzima monoaminoxidasa (MAO) a di-hidroxi-fenil-acido acético (DOPAC), produciendo una molécula de H_2O_2 por cada molécula de DA metabolizada (Jakel and Maragos, 2000; Sulzer et al., 1993). Por tanto, si reducimos este pool de DA citoplasmática, como parece que hace el (-)-OSU6162 aumentando la liberación de DA inducida por anfetamina, se reduciría el riesgo de estrés oxidativo celular producido por un exceso de radicales libres en neuronas dopaminérgicas.

Nuestros datos demuestran que las células estriales Q111 son mucho más sensibles a los efectos tóxicos del H_2O_2 , rotenona y ácido 3NP que las células Q7,

sugiriendo que el aumento en la cantidad de radicales libres y el daño mitocondrial son potenciales factores patogénicos en la enfermedad de Huntington. (-)-OSU6162 a la concentración de 150 μ M, revierte completa o parcialmente los efectos tóxicos del H_2O_2 , rotenona y 3NP. No existen evidencias directas del efecto antioxidante del (-)-OSU6162 aunque el reclutamiento de radicales libres y la mejora de la función mitocondrial puede ser un efecto indirecto. Este mecanismo indirecto podría estar relacionado con el efecto sobre la disminución en la liberación de DA, debido a una reducción de la actividad del enzima MAO y de la producción de radicales libres.

El BDNF estriatal se produce mayoritariamente en neuronas glutamatérgicas cortico-estriatales, pero probablemente exista una producción adicional intrínseca de BDNF en neuronas estriatales (Perez-Navarro et al., 2005). Nosotros hemos investigado si los efectos beneficiosos del (-)-OSU6162 podrían estar mediados por un aumento en la producción intrínseca de BDNF en nuestro modelo celular. Los niveles basales de BDNF son menores en células mutadas Q111 que en células control Q7. En las células control podemos observar una recuperación de los niveles de BDNF gracias al (-)-OSU6162 frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 , mientras que en células Q111 no vemos este efecto, quizá debido a que los niveles de BDNF en células mutadas son prácticamente indetectables.

También hemos podido observar algunos de los posibles mecanismos de acción del (-)-OSU6162. El fármaco aumenta el ratio de supervivencia/muerte Bcl2/Bax y reduce el ratio p-ERK/ERKtotal en células control y mutadas, lo que podría estar demostrando un aumento en la supervivencia celular. Se ha descrito que la actividad ERK afecta directamente a la función mitocondrial promoviendo la liberación de citocromo C y modulando la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. La fosforilación de ERK aumenta los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax que junto a la liberación del citocromo C al citoplasma, activan la cascada de caspasas que promueven la muerte celular (Cagnol and Chambard, 2009). Por lo tanto, (-)-OSU6162 disminuye la presencia de p-ERK y se reduce la muerte celular. Las células Q111 tienen niveles de GSH muy reducidos en comparación con los de las células Q7. Así, aunque parece que el (-)-OSU6162 tiene propiedades antioxidantes, éstas no serían mediadas por un aumento en los niveles de GSH intracelular.

A modo de resumen podríamos decir que el fármaco estabilizador de dopamina (-)-OSU6162, protege a las células estriatales control y mutadas frente a diversos tóxicos celulares. Este efecto neuroprotector podría estar mediado por múltiples mecanismos incluyendo la regulación sináptica de DA, la recaptación directa o indirecta de radicales libres y recuperación de la función mitocondrial, aumento de la expresión de BDNF y de proteínas antiapoptóticas, y una reducción de la fosforilación de ERK.

4. Efecto neuroprotector del medio condicionado de glía

Las células mesencefálicas de glía en cultivo, al someterlas a una situación de estrés como es la retirada de suero del medio, comienzan a secretar pequeños antioxidantes como GSH y ácido ascórbico, y factores neurotróficos como el GDNF, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) y bFGF así como nuevos factores neurotróficos dopaminérgicos (Engel et al., 1991; Hoffer et al., 1994; Lin et al., 1993; Mena et al., 1997; Mena et al., 2002; Muller et al., 1995; Panchision et al., 1998; Reuss and Unsicker, 2000; Takeshima et al., 1994). Como hemos mencionado anteriormente, Este medio rico y potente neuroprotector se denomina medio condicionado de glía (MCG). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que el MCG procedente de glía mesencefálica protege a las neuronas dopaminérgicas de la toxicidad producida por MPP⁺, protege cultivos neuronales fetales de mesencéfalo frente al daño provocado por óxido nítrico, y aumenta la generación de neuronas productoras de TH a partir de células precursoras (Mena et al., 2002). Por tanto, decidimos probar este medio tan potente en un modelo de la enfermedad de Huntington.

En este estudio hemos podido comprobar que tanto el MCG fetal obtenido de células de glía del estriado de embriones en estadio E16 como el MCG postnatal obtenido a partir del estriado de ratones de 13 días y 2 meses de edad, protegen frente a la toxicidad provocada por diversas toxinas como el glutamato, peróxido de hidrógeno y el ácido 3-NP en células estriatales inmortalizadas mutantes para huntingtina Q111. Todos los mecanismos de neurotoxicidad disparados por las diferentes neurotoxinas utilizadas en nuestros experimentos, incluyen una neurotransmisión excitatoria anormal, daño en la función mitocondrial, y un exceso en el estrés oxidativo que ya han sido demostrados tanto en pacientes como en modelos animales de la enfermedad (Browne et al., 1997; Chen, 2011; Polidori et al., 1999)

El glutamato es el amino ácido excitador por excelencia del sistema nervioso central. A dosis elevadas, el glutamato provoca daño neuronal bajo condiciones *in vitro* (Ankarcrona et al., 1995; Choi, 1987; Li et al., 2007). Como hemos mencionado anteriormente, las neuronas estriatales medianas espinosas (NMEs) contienen GABA y otros neurotransmisores, son particularmente vulnerables y van desapareciendo conforme aumenta la severidad de los síntomas de la enfermedad (Myers et al., 1988). El ácido quinolínico, y agonistas del receptor del NMDA como el glutamato y metabolitos endógenos del triptófano, estimulan numerosos cambios químicos en la EH (Ferrante et al., 1993). Se ha demostrado que la familia del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), la neurturina, sus receptores presentes en el estriado y sus conexiones con

cortex y sustancia nigra, muestran una respuesta selectiva neurotrófica frente a daños excitotóxicos (Alberch et al., 2002). Nuestros datos muestran que el MCG fetal (que contiene factores neurotróficos como el GDNF, BDNF y FGF) protege frente a la muerte celular provocada por la adición de glutamato externo y aumentan la captación de [^3H]-GABA en las células estriatales mutadas Q111, lo que podría estar indicando que el MCG está protegiendo directamente a las NMEs.

A continuación quisimos probar la eficacia del MCG en modelos de toxicidad mitocondrial y de estrés oxidativo usando el ácido 3NP y el H_2O_2 . Como se ha comentado anteriormente, el 3NP es una toxina natural capaz de inhibir de manera irreversible la enzima succinato deshidrogenasa presente en el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. En las células Q111, la administración de 3NP provoca un descenso en la supervivencia celular y un aumento en la necrosis y apoptosis. Al tratar las células con MCG éstas recuperan los niveles de actividad mitocondrial y se reduce la muerte celular. Para estudiar el efecto del MCG postnatal, usamos como modelo de neurotoxicidad el daño oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 provoca una acumulación de radicales libres y la poliubiquitinización de proteínas en las células Q111, ambos efectos son revertidos por el MCG fetal hasta niveles cercanos a los del control. El MCG postnatal de 13 días y de 2 meses también disminuye la muerte provocada por radicales libres. La chaperona HSP70 aumenta en presencia de H_2O_2 y con el MCG vuelve a niveles basales. La proteína PARP es cortada por caspasas y es reconocida como un marcador de apoptosis celular (Tong et al., 2001). El peróxido de hidrógeno activa el corte de esta proteína y el MCG previene este efecto. El MCG disminuye la producción de ROS provocada por el H_2O_2 .

El MCG fetal aumenta los niveles del antioxidante GSH en células Q111 y revierte el efecto de depleción provocado por el H_2O_2 . El GSH es un importante antioxidante producido por las células de glía y con propiedades neurotróficas en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. El GSH juega un papel muy importante en la protección frente a estrés oxidativo y en funciones como la de retirar el H_2O_2 producida por la MAO (Makar et al., 1994; Meister, 1988). Por ello, el MCG protege a las células Q111 del estrés oxidativo aumentando la cantidad de GSH intracelular.

Como hemos comentado, el MCG contiene factores neurotróficos, por ello, quisimos probar la eficacia de algunos de estos en solitario y comparar el efecto neuroprotector con el del MCG en el modelo de toxicidad inducida por H_2O_2 . Existen numerosos trabajos acerca de los beneficios de determinados factores neurotróficos en la enfermedad de Huntington. El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es un

importante factor neuroprotector que actúa preservando la integridad de las NMEs en el estriado. En Huntington se observa una reducción en los niveles de BDNF (Alberch et al., 2004; Ferrer et al., 2000). Estudios *in vivo* han demostrado que la producción y la liberación condicionada de BDNF en astrocitos es un método seguro y neuroprotector para mejorar el fenotipo de los ratones R6/2 (Giralt et al., 2011). La sobreexpresión de BDNF en cerebro de ratones YAC128 que expresan la huntintina completa con 128 repeticiones de CAG, previene la disfunción motora, revierte algunos déficits cognitivos, previene la atrofia y pérdida de neuronas estriatales y estabiliza el tamaño de las espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas estriatales de estos ratones (Xie et al., 2010). Con estos resultados observados *in vivo*, probamos el BDNF en nuestro modelo *in vitro* con las células Q111 y comparamos su efecto protector frente al observado con el MCG, pudiendo comprobar que el BDNF disminuye la apoptosis provocada por estrés oxidativo hasta niveles similares a los del control pero no tiene un efecto tan potente como el producido por el MCG. Otro factor neurotrófico que hemos utilizado es el GDNF, que como hemos explicado anteriormente es neuroprotector en un modelo de excitotoxicidad y también protege a las células mutadas Q111 del estrés oxidativo producido por ROS, pero sigue siendo menos protector que el MCG. Por último, probamos el factor derivado de fibroblastos básico (bFGF). Estudios preliminares en las líneas celulares STHdh^{Q7/Q7} y STHdh^{Q111/Q111} y en ratones R6/2, demuestran que el FGF-2 estimula neurogénesis, es neuroprotector al observarse una reducción en la muerte neuronal y en la agregación proteica, y estabiliza la expresión de DARPP-32 y del receptor CB1 de cannabinoides y en los ratones R6/2 aumenta la longevidad (Jin et al., 2005). En nuestro estudio en las células Q111, hemos observado una leve mejoría en el porcentaje de células apoptóticas inducida por H₂O₂, pero mucho menor que la que presentan las células tratadas con MGC.

Por lo tanto, podríamos concluir este apartado diciendo que, tanto el MCG fetal como el postnatal, protegen a las neuronas estriatales mutadas de la muerte espontánea y de los efectos tóxicos producidos por diferentes neurotóxicos como aminoácidos excitadores, venenos mitocondriales y donadores de radicales libres, que producen la muerte de neuronas estriatales y son modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad. Es más, los efectos neuroprotectores del MCG son más potentes que los efectos neuroprotectores demostrados de determinados factores neurotróficos, lo que indica que este medio podría ser un nuevo y muy efectivo agente terapéutico en la enfermedad de Huntington.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Las inclusiones de huntingtina, características de la EH en cerebro, aparecen al mes de edad en ratones R6/1 y van aumentando conforme avanza la edad de los ratones.
2. La supresión parcial de parkina en ratones R6/1/PK^{+/-}, empeora la conducta motora observada en ratones R6/1. Los ratones dobles mutantes R6/1/PK^{+/-} presentan en el estriado, mayor número de células TUNEL⁺ y mayores niveles de la proteína apoptótica Bax que los ratones R6/1.
3. Los ratones R6/1/PK^{+/-} parecen tener aumentados otros mecanismos de degradación de proteínas compensatorios por el déficit en parkina como son los niveles de LC3II/LC3I.
4. La dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra en ratones R6/1 sintomáticos, retrasa la pérdida de peso característica de esta enfermedad, disminuye las inclusiones de huntingtina en el estriado y reduce el número de células TUNEL⁺.
5. La dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra en ratones R6/1 asintomáticos a partir de dos meses de edad y hasta su sacrificio, reduce las inclusiones de huntingtina en el estriado e hipocampo de ratones R6/1.
6. La dieta suplementada con aceite de oliva disminuye los signos de lesión sobre el sistema dopaminérgico, acortamiento de la longitud de zancada y pérdida de neuronas TH⁺, que se observan en ratones R6/1.
7. El fármaco estabilizador de dopamina (-)-OSU6162, reduce la muerte celular producida por la privación de suero en células Q7 y Q111. También hemos visto que protege frente a la muerte celular inducida por tóxicos como el glutamato, peróxido de hidrógeno, rotenona y ácido 3NP.

8. (-)- OSU6162 disminuye los niveles de expresión de la proteína p-ERK y aumenta el ratio de las proteínas anti y pro-apoptóticas Bcl2/Bax, lo que indica una reducción de la muerte celular.
9. El medio condicionado de glía tiene capacidad protectora y regeneradora en las células mutadas Q111 tras el tratamiento con los neurotóxicos glutamato, H_2O_2 y 3NP. El H_2O_2 aumenta la expresión de la proteína PARP implicada en muerte celular y los niveles de proteínas ubiquitinizadas, efectos que se ven revertidos por la presencia de MCG estriatal fetal.
10. Los factores de crecimiento bFGF, BDNF y GDNF poseen un efecto beneficioso sobre las células Q111, sin embargo, frente a la toxicidad inducida por H_2O_2 , protegen de manera menos eficiente que el MCG fetal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBILIOGRAFÍA

- Adam, O.R. and Jankovic, J., 2008. Symptomatic treatment of Huntington disease. *Neurotherapeutics*, 5 (2), 181-97.
- Alberch, J., Perez-Navarro, E. and Canals, J.M., 2002. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*, 57 (6), 817-22.
- Alberch, J., Perez-Navarro, E. and Canals, J.M., 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res*, 146, 195-229.
- Andre, V.M., Cepeda, C. and Levine, M.S., 2010. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther*, 16 (3), 163-78.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A. and et al., 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*, 4 (4), 398-403.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. and Nicotera, P., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15 (4), 961-73.
- Aziz, N.A., van der Marck, M.A., Pijl, H., Olde Rikkert, M.G., Bloem, B.R. and Roos, R.A., 2008. Weight loss in neurodegenerative disorders. *J Neurol*, 255 (12), 1872-80.
- Bachoud-Levi, A.C., Gaura, V., Brugieres, P., Lefaucheur, J.P., Boisse, M.F., Maison, P., Baudic, S., Ribeiro, M.J., Bourdet, C., Remy, P., Cesaro, P., Hantraye, P. and Peschanski, M., 2006. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol*, 5 (4), 303-9.
- Balleine, B.W., Liljeholm, M. and Ostlund, S.B., 2009. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res*, 199 (1), 43-52.
- Bamford, K.A., Caine, E.D., Kido, D.K., Cox, C. and Shoulson, I., 1995. A prospective evaluation of cognitive decline in early Huntington's disease: functional and radiographic correlates. *Neurology*, 45 (10), 1867-73.
- Basille, C., Frydman, R., El Aly, A., Hesters, L., Fanchin, R., Tachdjian, G., Steffann, J., LeLor'h, M. and Achour-Frydman, N., 2009. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 145 (1), 9-13.
- Beal, M.F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*, 58 (4), 495-505.
- Beal, M.F., Marshall, P.E., Burd, G.D., Landis, D.M. and Martin, J.B., 1985. Excitotoxin lesions do not mimic the alteration of somatostatin in Huntington's disease. *Brain Res*, 361 (1-2), 135-45.
- Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H. and Kopito, R.R., 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*, 448 (7154), 704-8.
- Bensimon, G., Ludolph, A., Agid, Y., Vidailhet, M., Payan, C. and Leigh, P.N., 2009. Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: the NNIPPS study. *Brain*, 132 (Pt 1), 156-71.
- Besson, M.T., Dupont, P., Fridell, Y.W. and Lievens, J.C., 2010. Increased energy metabolism rescues glia-induced pathology in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 19 (17), 3372-82.
- Bett, J.S., Goellner, G.M., Woodman, B., Pratt, G., Rechsteiner, M. and Bates, G.P., 2006. Proteasome impairment does not contribute to pathogenesis in R6/2

- Huntington's disease mice: exclusion of proteasome activator REGgamma as a therapeutic target. *Hum Mol Genet*, 15 (1), 33-44.
- Blazquez, C., Chiarlone, A., Sagredo, O., Aguado, T., Pazos, M.R., Resel, E., Palazuelos, J., Julien, B., Salazar, M., Borner, C., Benito, C., Carrasco, C., Diez-Zaera, M., Paoletti, P., Diaz-Hernandez, M., Ruiz, C., Sendtner, M., Lucas, J.J., de Yebenes, J.G., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Romero, J., Alberch, J., Gines, S., Kraus, J., Fernandez-Ruiz, J., Galve-Roperh, I. and Guzman, M., 2011. Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain*, 134 (Pt 1), 119-36.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A. and Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, 196 (Pt 4) 527-42.
- Bradford, J., Shin, J.Y., Roberts, M., Wang, C.E., Li, X.J. and Li, S., 2009. Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (52), 22480-5.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N. and Blum, D., 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*, 95 (6), 1521-40.
- Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D. and Beal, M.F., 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol*, 41 (5), 646-53.
- Burstein, E.S., Carlsson, M.L., Owens, M., Ma, J.N., Schiffer, H.H., Carlsson, A. and Hacksell, U., 2011. II. In vitro evidence that (-)-OSU6162 and (+)-OSU6162 produce their behavioral effects through 5-HT_{2A} serotonin and D₂ dopamine receptors. *J Neural Transm*, 118 (11), 1523-33.
- Bustamante-Aragones, A., Trujillo-Tiebas, M.J., Gallego-Merlo, J., Rodriguez de Alba, M., Gonzalez-Gonzalez, C., Cantalapiedra, D., Ayuso, C. and Ramos, C., 2008. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol*, 15 (12), 1338-44.
- Cagnol, S. and Chambard, J.C., 2009. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *Febs J*, 277 (1), 2-21.
- Canals, J.M., Pineda, J.R., Torres-Peraza, J.F., Bosch, M., Martin-Ibanez, R., Munoz, M.T., Mengod, G., Ernfors, P. and Alberch, J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*, 24 (35), 7727-39.
- Canals, S., Casarejos, M.J., Rodriguez-Martin, E., de Bernardo, S. and Mena, M.A., 2001. Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures. *J Neurochem*, 76 (1), 56-68.
- Carlsson, A., Magnusson, T., Svensson, T.H. and Waldeck, B., 1973. Effect of ethanol on the metabolism of brain catecholamines. *Psychopharmacologia*, 30 (1), 27-36.
- Carlsson, M.L., Burstein, E.S., Kloborg, A., Hansson, S., Schedwin, A., Nilsson, M., Rung, J.P. and Carlsson, A., 2011. I. In vivo evidence for partial agonist effects of (-)-OSU6162 and (+)-OSU6162 on 5-HT_{2A} serotonin receptors. *J Neural Transm*, 118 (11), 1511-22.
- Carlsson, M.L., Carlsson, A. and Nilsson, M., 2004. Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back. *Curr Med Chem*, 11 (3), 267-77.
- Cattaneo, E., Zuccato, C. and Tartari, M., 2005. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 6 (12), 919-30.
- Caviston, J.P. and Holzbaur, E.L., 2009. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol*, 19 (4), 147-55.

- Chen, C.M., 2011. Mitochondrial dysfunction, metabolic deficits, and increased oxidative stress in Huntington's disease. *Chang Gung Med J*, 34 (2), 135-52.
- Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7 (2), 369-79.
- Cicerale, S., Lucas, L. and Keast, R., 2010. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci*, 11 (2), 458-79.
- Ciechanover, A., 2003. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem Soc Trans*, 31 (2), 474-81.
- Ciechanover, A., 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (1), 79-87.
- CollaborativeResearchGroup, H.s.D., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72 (6), 971-83.
- Cowan, C.M. and Raymond, L.A., 2006. Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr Top Dev Biol*, 75, 25-71.
- Cummings, J.L. and Cunningham, K., 1992. Obsessive-compulsive disorder in Huntington's disease. *Biol Psychiatry*, 31 (3), 263-70.
- de Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M.J., Rodriguez-Martin, E. and Mena, M.A., 2003. Glia-conditioned medium induces de novo synthesis of tyrosine hydroxylase and increases dopamine cell survival by differential signaling pathways. *J Neurosci Res*, 73 (6), 818-30.
- de Yebenes, J.G., Landwehrmeyer, B., Squitieri, F., Reilmann, R., Rosser, A., Barker, R.A., Saft, C., Magnet, M.K., Sword, A., Rembratt, A. and Tedroff, J., 2011. Pridopidine for the treatment of motor function in patients with Huntington's disease (MermaiHD): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 10 (12), 1049-1057.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 115 (1), 61-9.
- Dedeoglu, A., Kubilus, J.K., Jeitner, T.M., Matson, S.A., Bogdanov, M., Kowall, N.W., Matson, W.R., Cooper, A.J., Ratan, R.R., Beal, M.F., Hersch, S.M. and Ferrante, R.J., 2002. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci*, 22 (20), 8942-50.
- Desplats, P.A., Kass, K.E., Gilmartin, T., Stanwood, G.D., Woodward, E.L., Head, S.R., Sutcliffe, J.G. and Thomas, E.A., 2006. Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem*, 96 (3), 743-57.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A. and et al., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, 14 (5), 1075-81.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. and Aronin, N., 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277 (5334), 1990-3.
- Doig, N.M., Moss, J. and Bolam, J.P., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci*, 30 (44), 14610-8.
- Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ladenheim, B., Xu, X., Cadet, J.L. and Mattson, M.P., 2004. Paroxetine retards disease onset and progression in Huntington mutant mice. *Ann Neurol*, 55 (4), 590-4.

- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L. and et al., 1995. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, 269 (5222), 407-10.
- Dyhring, T., Nielsen, E.O., Sonesson, C., Pettersson, F., Karlsson, J., Svensson, P., Christophersen, P. and Waters, N., 2009. The dopaminergic stabilizers pridopidine (ACR16) and (-)-OSU6162 display dopamine D(2) receptor antagonism and fast receptor dissociation properties. *Eur J Pharmacol*, 628 (1-3), 19-26.
- Ekesbo, A., Andren, P.E., Gunne, L.M. and Tedroff, J., 1997. (-)-OSU 6162 inhibits levodopa-induced dyskinesias in a monkey model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, 8 (11), 2567-70.
- Engel, J., Schubert, D. and Bohn, M.C., 1991. Conditioned media derived from glial cell lines promote survival and differentiation of dopaminergic neurons in vitro: role of mesencephalic glia. *J Neurosci Res*, 30 (2), 359-71.
- Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, K.L., Jenkins, B.G., Hersch, S.M. and Beal, M.F., 2002. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci*, 22 (5), 1592-9.
- Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Cipolloni, P.B., Storey, E. and Beal, M.F., 1993. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol*, 119 (1), 46-71.
- Ferrer, I., Goutan, E., Marin, C., Rey, M.J. and Ribalta, T., 2000. Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res*, 866 (1-2), 257-61.
- Frank, S., 2010. Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Huntington disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 6, 657-65.
- Freeman, T.B., Cicchetti, F., Hauser, R.A., Deacon, T.W., Li, X.J., Hersch, S.M., Nauert, G.M., Sanberg, P.R., Kordower, J.H., Saporta, S. and Isacson, O., 2000. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25), 13877-82.
- Galvan, A. and Wichmann, T., 2008. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*, 119 (7), 1459-74.
- Gaura, V., Bachoud-Levi, A.C., Ribeiro, M.J., Nguyen, J.P., Frouin, V., Baudic, S., Brugieres, P., Mangin, J.F., Boisse, M.F., Palfi, S., Cesaro, P., Samson, Y., Hantraye, P., Peschanski, M. and Remy, P., 2004. Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain*, 127 (Pt 1), 65-72.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S. and Saudou, F., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118 (1), 127-38.
- Gharami, K., Xie, Y., An, J.J., Tonegawa, S. and Xu, B., 2008. Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice. *J Neurochem*, 105 (2), 369-79.
- Giasson, B.I. and Lee, V.M., 2003. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell*, 114 (1), 1-8.
- Gillis, J.C., Benefield, P. and McTavish, D., 1994. Idebenone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in age-related cognitive disorders. *Drugs Aging*, 5 (2), 133-52.
- Gines, S., Seong, I.S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J.F., Wheeler, V.C., Persichetti, F. and MacDonald, M.E., 2003. Specific progressive cAMP

- reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Hum Mol Genet*, 12 (5), 497-508.
- Giralt, A., Carreton, O., Lao-Peregrin, C., Martin, E.D. and Alberch, J., 2011. Conditional BDNF release under pathological conditions improves Huntington's disease pathology by delaying neuronal dysfunction. *Mol Neurodegener*, 6 (1), 71.
- Gonzalez-Alegre, P. and Afifi, A.K., 2006. Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) Huntington disease: report of 12 patients and review of the literature. *J Child Neurol*, 21 (3), 223-9.
- Grafton, S.T., Mazziotta, J.C., Pahl, J.J., St George-Hyslop, P., Haines, J.L., Gusella, J., Hoffman, J.M., Baxter, L.R. and Phelps, M.E., 1992. Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Arch Neurol*, 49 (11), 1161-7.
- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W. and Kimura, M., 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265 (5180), 1826-31.
- Gunawardena, S., Her, L.S., Brusch, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M. and Goldstein, L.S., 2003. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron*, 40 (1), 25-40.
- Ha, A.D. and Jankovic, J., 2011. Exploring the correlates of intermediate CAG repeats in Huntington disease. *Postgrad Med*, 123 (5), 116-21.
- Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K. and Winston, R.M., 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344 (6268), 768-70.
- Harper, P.S., 1992. The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet*, 89 (4), 365-76.
- Henderson, S.T., 2008. Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 (3), 470-80.
- Heng, M.Y., Detloff, P.J. and Albin, R.L., 2008. Rodent genetic models of Huntington disease. *Neurobiol Dis*, 32 (1), 1-9.
- Herrero, M.T., Barcia, C. and Navarro, J.M., 2002. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst*, 18 (8), 386-404.
- Hersch, S., Fink, K., Vonsattel, J.P. and Friedlander, R.M., 2003. Minocycline is protective in a mouse model of Huntington's disease. *Ann Neurol*, 54 (6), 841; author reply 842-3.
- Hickey, M.A. and Chesselet, M.F., 2003. The use of transgenic and knock-in mice to study Huntington's disease. *Cytogenet Genome Res*, 100 (1-4), 276-86.
- Ho, A.K., Sahakian, B.J., Brown, R.G., Barker, R.A., Hodges, J.R., Ane, M.N., Snowden, J., Thompson, J., Esmonde, T., Gentry, R., Moore, J.W. and Bodner, T., 2003. Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology*, 61 (12), 1702-6.
- Hoenicka, J., Vidal, L., Morales, B., Ampuero, I., Jimenez-Jimenez, F.J., Berciano, J., del Ser, T., Jimenez, A., Ruiz, P.G. and de Yebenes, J.G., 2002. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol*, 59 (6), 966-70.
- Hoffer, B.J., Hoffman, A., Bowenkamp, K., Huettl, P., Hudson, J., Martin, D., Lin, L.F. and Gerhardt, G.A., 1994. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett*, 182 (1), 107-11.
- Huang, C.C., Faber, P.W., Persichetti, F., Mittal, V., Vonsattel, J.P., MacDonald, M.E. and Gusella, J.F., 1998. Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet*, 24 (4), 217-33.

- Hunter, J.M., Lesort, M. and Johnson, G.V., 2007. Ubiquitin-proteasome system alterations in a striatal cell model of Huntington's disease. *J Neurosci Res*, 85 (8), 1774-88.
- Huntington Study, G., 2006. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: a randomized controlled trial. *Neurology*, 66 (3), 366-72.
- Iannicola, C., Moreno, S., Oliverio, S., Nardacci, R., Ciofi-Luzzatto, A. and Piacentini, M., 2000. Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 75 (2), 830-9.
- Itier, J.M., Ibanez, P., Mena, M.A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G.A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M.J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., Gallego, E., Sanchez, M., Deneffe, P., Benavides, J., Tremp, G., Rooney, T.A., Brice, A. and Garcia de Yebenes, J., 2003. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*, 12 (18), 2277-91.
- Jakel, R.J. and Maragos, W.F., 2000. Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci*, 23 (6), 239-45.
- Jarrett, S.G., Milder, J.B., Liang, L.P. and Patel, M., 2008. The ketogenic diet increases mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem*, 106 (3), 1044-51.
- Jenkins, B.G., Rosas, H.D., Chen, Y.C., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M., Rosen, B.R., Beal, M.F. and Koroshetz, W.J., 1998. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology*, 50 (5), 1357-65.
- Jin, K., LaFevre-Bernt, M., Sun, Y., Chen, S., Gafni, J., Crippen, D., Logvinova, A., Ross, C.A., Greenberg, D.A. and Ellerby, L.M., 2005. FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (50), 18189-94.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*, 19 (21), 5720-8.
- Kim, M., Lee, H.S., LaForet, G., McIntyre, C., Martin, E.J., Chang, P., Kim, T.W., Williams, M., Reddy, P.H., Tagle, D., Boyce, F.M., Won, L., Heller, A., Aronin, N. and DiFiglia, M., 1999. Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci*, 19 (3), 964-73.
- Kirkwood, S.C., Siemers, E., Viken, R., Hodes, M.E., Conneally, P.M., Christian, J.C. and Foroud, T., 2002. Longitudinal personality changes among presymptomatic Huntington disease gene carriers. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 15 (3), 192-7.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392 (6676), 605-8.
- Kloppel, S., Draganski, B., Siebner, H.R., Tabrizi, S.J., Weiller, C. and Frackowiak, R.S., 2009. Functional compensation of motor function in pre-symptomatic Huntington's disease. *Brain*, 132 (Pt 6), 1624-32.
- Kreitzer, A.C. and Malenka, R.C., 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60 (4), 543-54.
- Kremer, B., Weber, B. and Hayden, M.R., 1992. New insights into the clinical features, pathogenesis and molecular genetics of Huntington disease. *Brain Pathol*, 2 (4), 321-35.

- Landwehrmeyer, G.B., Dubois, B., de Yebenes, J.G., Kremer, B., Gaus, W., Kraus, P.H., Przuntek, H., Dib, M., Doble, A., Fischer, W. and Ludolph, A.C., 2007. Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Ann Neurol*, 62 (3), 262-72.
- Lee, W.C., Yoshihara, M. and Littleton, J.T., 2004. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (9), 3224-9.
- Lepore, A.C., Neuhuber, B., Connors, T.M., Han, S.S., Liu, Y., Daniels, M.P., Rao, M.S. and Fischer, I., 2006. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience*, 142 (1), 287-304.
- Levine, B. and Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1), 27-42.
- Li, H., Li, S.H., Johnston, H., Shelbourne, P.F. and Li, X.J., 2000. Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet*, 25 (4), 385-9.
- Li, N., Liu, B., Dluzen, D.E. and Jin, Y., 2007. Protective effects of ginsenoside Rg2 against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Ethnopharmacol*, 111 (3), 458-63.
- Li, S.H. and Li, X.J., 2004. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet*, 20 (3), 146-54.
- Li, X., Wang, C.E., Huang, S., Xu, X., Li, X.J., Li, H. and Li, S., 2010. Inhibiting the ubiquitin-proteasome system leads to preferential accumulation of toxic N-terminal mutant huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, 19 (12), 2445-55.
- Lievens, J.C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boskovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L. and Bates, G.P., 2001. Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 8 (5), 807-21.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S. and Collins, F., 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260 (5111), 1130-2.
- Lucas, L., Russell, A. and Keast, R., 2011. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr Pharm Des*, 17 (8), 754-68.
- Lucking, C.B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N.W., Agid, Y. and Brice, A., 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, 342 (21), 1560-7.
- Lundin, A., Dietrichs, E., Haghighi, S., Goller, M.L., Heiberg, A., Loutfi, G., Widner, H., Wiktorin, K., Wiklund, L., Svenningsson, A., Sonesson, C., Waters, N., Waters, S. and Tedroff, J., 2010. Efficacy and safety of the dopaminergic stabilizer Pridopidine (ACR16) in patients with Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol*, 33 (5), 260-4.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spektor, B.S., Penney, E.B., Schilling, G., Ross, C.A., Borchelt, D.R., Tapscott, S.J., Young, A.B., Cha, J.H. and Olson, J.M., 2000. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 9 (9), 1259-71.
- Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y. and Rho, J.M., 2007. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience*, 145 (1), 256-64.
- Maat-Kievit, A., Losekoot, M., Van Den Boer-Van Den Berg, H., Van Ommen, G.J., Niermeijer, M., Breuning, M. and Tibben, A., 2001. New problems in testing for

- Huntington's disease: the issue of intermediate and reduced penetrance alleles. *J Med Genet*, 38 (4), E12.
- Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S. and Cooper, A.J., 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem*, 62 (1), 45-53.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. and Bates, G.P., 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87 (3), 493-506.
- Mao, Z., Choo, Y.S. and Lesort, M., 2006. Cystamine and cysteamine prevent 3-NP-induced mitochondrial depolarization of Huntington's disease knock-in striatal cells. *Eur J Neurosci*, 23 (7), 1701-10.
- Marsh, J.L., Pallos, J. and Thompson, L.M., 2003. Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R187-93.
- Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S.U., Bredesen, D.E., Tufaro, F. and Hayden, M.R., 1998. Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet*, 18 (2), 150-4.
- Meister, A., 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263 (33), 17205-8.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Carazo, A., Paino, C.L. and Garcia de Yebenes, J., 1996. Glia conditioned medium protects fetal rat midbrain neurones in culture from L-DOPA toxicity. *Neuroreport*, 7 (2), 441-5.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Carazo, A., Paino, C.L. and Garcia de Yebenes, J., 1997. Glia protect fetal midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J Neural Transm*, 104 (4-5), 317-28.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Estrada, C. and de Yebenes, J.G., 1994. Effects of retinoic acid on NB 69 human neuroblastoma cells and fetal rat mid brain neurons. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 8 (1-2), 85-97.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Gimenez-Gallego, G. and Garcia de Yebenes, J., 1995. Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons in vitro. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 9 (1), 1-14.
- Mena, M.A., de Bernardo, S., Casarejos, M.J., Canals, S. and Rodriguez-Martin, E., 2002. The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. *Mol Neurobiol*, 25 (3), 245-63.
- Mena, M.A., Pardo, B., Paino, C.L. and De Yebenes, J.G., 1993. Levodopa toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture: modulation by ascorbic acid. *Neuroreport*, 4 (4), 438-40.
- Menalled, L., El-Khodori, B.F., Patry, M., Suarez-Farinas, M., Orenstein, S.J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X.W., MacDonald, M., Morton, A.J., Bates, G., Leeds, J., Park, L., Howland, D., Signer, E., Tobin, A. and Brunner, D., 2009. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol Dis*, 35 (3), 319-36.
- Michalik, A. and Van Broeckhoven, C., 2004. Proteasome degrades soluble expanded polyglutamine completely and efficiently. *Neurobiol Dis*, 16 (1), 202-11.
- Michel, P.P. and Hefti, F., 1990. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res*, 26 (4), 428-35.

- Milakovic, T. and Johnson, G.V., 2005. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem*, 280 (35), 30773-82.
- Miller, B.R. and Bezprozvanny, I., 2010. Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium. *Future Neurol*, 5 (5), 735-756.
- Morales, B., Martinez, A., Gonzalo, I., Vidal, L., Ros, R., Gomez-Tortosa, E., Rabano, A., Ampuero, I., Sanchez, M., Hoenicka, J. and Garcia De Yebenes, J., 2002. Steele-Richardson-Olszewski syndrome in a patient with a single C212Y mutation in the parkin protein. *Mov Disord*, 17 (6), 1374-80.
- Morton, A.J., Wood, N.I., Hastings, M.H., Hurelbrink, C., Barker, R.A. and Maywood, E.S., 2005. Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J Neurosci*, 25 (1), 157-63.
- Muller, H.W., Junghans, U. and Kappler, J., 1995. Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. *Pharmacol Ther*, 65 (1), 1-18.
- Myers, R.H., Vonsattel, J.P., Stevens, T.J., Cupples, L.A., Richardson, E.P., Martin, J.B. and Bird, E.D., 1988. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology*, 38 (3), 341-7.
- Napolitano, M., Centonze, D., Gubellini, P., Rossi, S., Spiezia, S., Bernardi, G., Gulino, A. and Calabresi, P., 2004. Inhibition of mitochondrial complex II alters striatal expression of genes involved in glutamatergic and dopaminergic signaling: possible implications for Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 15 (2), 407-14.
- Naver, B., Stub, C., Moller, M., Fenger, K., Hansen, A.K., Hasholt, L. and Sorensen, S.A., 2003. Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience*, 122 (4), 1049-57.
- Nilsson, M., Carlsson, A., Markinhuhta, K.R., Sonesson, C., Pettersson, F., Gullme, M. and Carlsson, M.L., 2004. The dopaminergic stabiliser ACR16 counteracts the behavioural primitivization induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in mice: implications for cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28 (4), 677-85.
- Paleacu, D., 2007. Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 3 (5), 545-51.
- Panchision, D.M., Martin-DeLeon, P.A., Takeshima, T., Johnston, J.M., Shimoda, K., Tsoulfas, P., McKay, R.D. and Commissiong, J.W., 1998. An immortalized, type-1 astrocyte of mesencephalic origin source of a dopaminergic neurotrophic factor. *J Mol Neurosci*, 11 (3), 209-21.
- Parker, J.A., Connolly, J.B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J. and Neri, C., 2001. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (23), 13318-23.
- Paul, S., 2007. Polyglutamine-mediated neurodegeneration: use of chaperones as prevention strategy. *Biochemistry (Mosc)*, 72 (4), 359-66.
- Paulsen, J.S., Ready, R.E., Hamilton, J.M., Mega, M.S. and Cummings, J.L., 2001. Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71 (3), 310-4.
- Perez-Navarro, E., Gavalda, N., Gratacos, E. and Alberch, J., 2005. Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem*, 92 (3), 678-91.
- Perez-Severiano, F., Rios, C. and Segovia, J., 2000. Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Res*, 862 (1-2), 234-7.

- Perucho, J., Casarejos, M.J., Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Ampuero, I., Rodal, I., Solano, R.M., Carro, E., Garcia de Yebenes, J. and Mena, M.A., 2009. The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice. *Exp Neurol*, 221 (1), 54-67.
- Perutz, M.F., Pope, B.J., Owen, D., Wanker, E.E. and Scherzinger, E., 2002. Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (8), 5596-600.
- Pettersson, F., Ponten, H., Waters, N., Waters, S. and Sonesson, C., 2010. Synthesis and evaluation of a set of 4-phenylpiperidines and 4-phenylpiperazines as D2 receptor ligands and the discovery of the dopaminergic stabilizer 4-[3-(methylsulfonyl)phenyl]-1-propylpiperidine (huntingexil, pridopidine, ACR16). *J Med Chem*, 53 (6), 2510-20.
- Polidori, M.C., Mecocci, P., Browne, S.E., Senin, U. and Beal, M.F., 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett*, 272 (1), 53-6.
- Ponten, H., Kullingsjo, J., Lagerkvist, S., Martin, P., Pettersson, F., Sonesson, C., Waters, S. and Waters, N., 2010. In vivo pharmacology of the dopaminergic stabilizer pridopidine. *Eur J Pharmacol*, 644 (1-3), 88-95.
- Qin, Z.H., Wang, J. and Gu, Z.L., 2005. Development of novel therapies for Huntington's disease: hope and challenge. *Acta Pharmacol Sin*, 26 (2), 129-42.
- Qin, Z.H., Wang, Y. and Chase, T.N., 1996. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors induces apoptosis in rat brain. *Brain Res*, 725 (2), 166-76.
- Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramirez-Tortosa, C., Battino, M., Huertas, J.R., Martin, Y. and Mataix, J., 2004. Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Exp Gerontol*, 39 (8), 1189-98.
- Quinn, N. and Schrag, A., 1998. Huntington's disease and other choreas. *J Neurol*, 245 (11), 709-16.
- Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B. and Young, A.B., 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (15), 5733-7.
- Reuss, B. and Unsicker, K., 2000. Survival and differentiation of dopaminergic mesencephalic neurons are promoted by dopamine-mediated induction of FGF-2 in striatal astroglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 16 (6), 781-92.
- Richfield, E.K., O'Brien, C.F., Eskin, T. and Shoulson, I., 1991. Heterogeneous dopamine receptor changes in early and late Huntington's disease. *Neurosci Lett*, 132 (1), 121-6.
- Roberts, R.C., Ahn, A., Swartz, K.J., Beal, M.F. and DiFiglia, M., 1993. Intrastriatal injections of quinolinic acid or kainic acid: differential patterns of cell survival and the effects of data analysis on outcome. *Exp Neurol*, 124 (2), 274-82.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Rodal, I., Perucho, J., Martinez, A., Furio, V., Ampuero, I., Casarejos, M.J., Solano, R.M., de Yebenes, J.G. and Mena, M.A., 2008. Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice. *Hum Mol Genet*, 17 (20), 3128-43.
- Roos, R.A., 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, 5 (1), 40.
- Ros, R., Ampuero, I. and Garcia de Yebenes, J., 2008. Parkin polymorphisms in progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci*, 268 (1-2), 176-8.
- Rosenstock, T.R., Duarte, A.I. and Rego, A.C., 2010. Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in Huntington's disease - from clinical features to the bench. *Curr Drug Targets*, 11 (10), 1218-36.

- Ross, C.A. and Tabrizi, S.J., 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, 10 (1), 83-98.
- Rothman, S.M. and Olney, J.W., 1995. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci*, 18 (2), 57-8.
- Roze, E., Cahill, E., Martin, E., Bonnet, C., Vanhoutte, P., Betuing, S. and Caboche, J., 2011. Huntington's Disease and Striatal Signaling. *Front Neuroanat*, 5, 55.
- Ruan, Q., Lesort, M., MacDonald, M.E. and Johnson, G.V., 2004. Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum Mol Genet*, 13 (7), 669-81.
- Rubinsztein, D.C., 2002. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, 18 (4), 202-9.
- Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J.A., Tomas-Zapico, C., Ruiz, C., Casarejos, M.J., Perucho, J., Gomez, A., Rodal, I., Lucas, J.J., Mena, M.A. and de Yébenes, J.G., 2009. Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice. *Brain Res*, 1281, 91-100.
- Ruiz, C., Casarejos, M.J., Rubio, I., Gines, S., Puigdemívol, M., Alberch, J., Mena, M.A. and de Yébenes, J.G., 2012. The dopaminergic stabilizer, (-)-OSU6162, rescues striatal neurons with normal and expanded polyglutamine chains in huntingtin protein from exposure to free radicals and mitochondrial toxins. *Brain Res*. 2012 Jun 12; 1459:100-12. Epub 2012 Apr 21.
- Rung, J.P., Rung, E., Helgeson, L., Johansson, A.M., Svensson, K., Carlsson, A. and Carlsson, M.L., 2008. Effects of (-)-OSU6162 and ACR16 on motor activity in rats, indicating a unique mechanism of dopaminergic stabilization. *J Neural Transm*, 115 (6), 899-908.
- Ruskin, D.N., Ross, J.L., Kawamura, M., Jr., Ruiz, T.L., Geiger, J.D. and Masino, S.A., 2011. A ketogenic diet delays weight loss and does not impair working memory or motor function in the R6/2 1J mouse model of Huntington's disease. *Physiol Behav*, 103 (5), 501-7.
- Rymar, V.V., Sasseville, R., Luk, K.C. and Sadikot, A.F., 2004. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol*, 469 (3), 325-39.
- Ryu, H., Rosas, H.D., Hersch, S.M. and Ferrante, R.J., 2005. The therapeutic role of creatine in Huntington's disease. *Pharmacol Ther*, 108 (2), 193-207.
- Sanberg, P.R. and Coyle, J.T., 1984. Scientific approaches to Huntington's disease. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol*, 1 (1), 1-44.
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A. and Rubinsztein, D.C., 2007. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 282 (8), 5641-52.
- Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O'Kane, C.J. and Rubinsztein, D.C., 2008. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*, 17 (2), 170-8.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Mangiarini, L., Mahal, A., Turmaine, M., Doherty, P., Davies, S.W. and Bates, G.P., 1999. Transgenic models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354 (1386), 963-9.
- Schiefer, J., Landwehrmeyer, G.B., Luesse, H.G., Sprunken, A., Puls, C., Milkereit, A., Milkereit, E. and Kosinski, C.M., 2002. Riluzole prolongs survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mov Disord*, 17 (4), 748-57.
- Sedvall, G., Karlsson, P., Lundin, A., Anvret, M., Suhara, T., Halldin, C. and Farde, L., 1994. Dopamine D1 receptor number--a sensitive PET marker for early brain

- degeneration in Huntington's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 243 (5), 249-55.
- Semaka, A., Collins, J.A. and Hayden, M.R., 2010. Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27-35 CAG repeats (intermediate alleles). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B (1), 314-20.
- Seong, I.S., Ivanova, E., Lee, J.M., Choo, Y.S., Fossale, E., Anderson, M., Gusella, J.F., Laramie, J.M., Myers, R.H., Lesort, M. and MacDonald, M.E., 2005. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet*, 14 (19), 2871-80.
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzok, J.A., Steiner, J.P., Lo, A. and et al., 1995. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron*, 14 (5), 1065-74.
- Siesling, S., Vegter-van der Vlis, M. and Roos, R.A., 1997. Juvenile Huntington disease in the Netherlands. *Pediatr Neurol*, 17 (1), 37-43.
- Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U. and Wanker, E.E., 2001. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 10 (12), 1307-15.
- Solano, R.M., Casarejos, M.J., Menendez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yebenes, J. and Mena, M.A., 2008. Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J Neurosci*, 28 (3), 598-611.
- Sonesson, C., Lin, C.H., Hansson, L., Waters, N., Svensson, K., Carlsson, A., Smith, M.W. and Wikstrom, H., 1994. Substituted (S)-phenylpiperidines and rigid congeners as preferential dopamine autoreceptor antagonists: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 37 (17), 2735-53.
- Squitieri, F., Orobello, S., Cannella, M., Martino, T., Romanelli, P., Giovacchini, G., Frati, L., Mansi, L. and Ciarmiello, A., 2009. Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36 (7), 1113-20.
- Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E. and Thompson, L.M., 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (12), 6763-8.
- Stembalska, A., Slezak, R., Pesz, K., Gil, J. and Sasiadek, M., 2007. Prenatal diagnosis-principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Folia Histochem Cytobiol*, 45 Suppl 1, S11-6.
- Sulzer, D., Maidment, N.T. and Rayport, S., 1993. Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons. *J Neurochem*, 60 (2), 527-35.
- Svensson, K., Hjorth, S., Clark, D., Carlsson, A., Wikstrom, H., Andersson, B., Sanchez, D., Johansson, A.M., Arvidsson, L.E., Hacksell, U. and et al., 1986. (+)-UH 232 and (+)-UH 242: novel stereoselective dopamine receptor antagonists with preferential action on autoreceptors. *J Neural Transm*, 65 (1), 1-27.
- Szebenyi, G., Morfini, G.A., Babcock, A., Gould, M., Selkoe, K., Stenoiien, D.L., Young, M., Faber, P.W., MacDonald, M.E., McPhaul, M.J. and Brady, S.T., 2003. Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron*, 40 (1), 41-52.
- Tabrizi, S.J., Workman, J., Hart, P.E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J.M. and Schapira, A.H., 2000. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol*, 47 (1), 80-6.

- Tadori, Y., Miwa, T., Tottori, K., Burris, K.D., Stark, A., Mori, T. and Kikuchi, T., 2005. Aripiprazole's low intrinsic activities at human dopamine D2L and D2S receptors render it a unique antipsychotic. *Eur J Pharmacol*, 515 (1-3), 10-9.
- Takeshima, T., Johnston, J.M. and Commissiong, J.W., 1994. Mesencephalic type 1 astrocytes rescue dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation. *J Neurosci*, 14 (8), 4769-79.
- Tasset, I., Pontes, A.J., Hinojosa, A.J., de la Torre, R. and Tunez, I., 2011. Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutr Neurosci*, 14 (3), 106-11.
- Tedroff, J., Ekesbo, A., Sonesson, C., Waters, N. and Carlsson, A., 1999. Long-lasting improvement following (-)-OSU6162 in a patient with Huntington's disease. *Neurology*, 53 (7), 1605-6.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 27 (3), 502-22.
- Tong, W.M., Cortes, U. and Wang, Z.Q., 2001. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1552 (1), 27-37.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V.C., Sharp, A.H., Persichetti, F., Cattaneo, E. and MacDonald, M.E., 2000. Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet*, 9 (19), 2799-809.
- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeberg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C. and McMurray, C.T., 2004. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, 24 (18), 8195-209.
- Tydlacka, S., Wang, C.E., Wang, X., Li, S. and Li, X.J., 2008. Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *J Neurosci*, 28 (49), 13285-95.
- van Dellen, A., Welch, J., Dixon, R.M., Cordery, P., York, D., Styles, P., Blakemore, C. and Hannan, A.J., 2000. N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport*, 11 (17), 3751-7.
- Vanitallie, T.B., Nonas, C., Di Rocco, A., Boyar, K., Hyams, K. and Heymsfield, S.B., 2005. Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study. *Neurology*, 64 (4), 728-30.
- Veech, R.L., 2004. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70 (3), 309-19.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. and Goldberg, A.L., 2004. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell*, 14 (1), 95-104.
- Videnovic, A., Leurgans, S., Fan, W., Jaglin, J. and Shannon, K.M., 2009. Daytime somnolence and nocturnal sleep disturbances in Huntington disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 (6), 471-4.
- Vonsattel, J.P. and DiFiglia, M., 1998. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57 (5), 369-84.

- Vonsattel, J.P., Keller, C. and Cortes Ramirez, E.P., 2011. Huntington's disease - neuropathology. *Handb Clin Neurol*, 100, 83-100.
- Wang, H., Lim, P.J., Karbowski, M. and Monteiro, M.J., 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum Mol Genet*, 18 (4), 737-52.
- Wang, J., Wang, C.E., Orr, A., Tydlacka, S., Li, S.H. and Li, X.J., 2008. Impaired ubiquitin-proteasome system activity in the synapses of Huntington's disease mice. *J Cell Biol*, 180 (6), 1177-89.
- Wang, L.H. and Qin, Z.H., 2006. Animal models of Huntington's disease: implications in uncovering pathogenic mechanisms and developing therapies. *Acta Pharmacol Sin*, 27 (10), 1287-302.
- Wang, X., Zhu, S., Drozda, M., Zhang, W., Stavrovskaya, I.G., Cattaneo, E., Ferrante, R.J., Kristal, B.S. and Friedlander, R.M., 2003. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (18), 10483-7.
- Wang, X., Zhu, S., Pei, Z., Drozda, M., Stavrovskaya, I.G., Del Signore, S.J., Cormier, K., Shimony, E.M., Wang, H., Ferrante, R.J., Kristal, B.S. and Friedlander, R.M., 2008. Inhibitors of cytochrome c release with therapeutic potential for Huntington's disease. *J Neurosci*, 28 (38), 9473-85.
- Wheeler, V.C., Auerbach, W., White, J.K., Srinidhi, J., Auerbach, A., Ryan, A., Duyao, M.P., Vrbanc, V., Weaver, M., Gusella, J.F., Joyner, A.L. and MacDonald, M.E., 1999. Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet*, 8 (1), 115-22.
- Xie, Y., Hayden, M.R. and Xu, B., 2010. BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *J Neurosci*, 30 (44), 14708-18.
- Zhao, Z., Lange, D.J., Voustantiouk, A., MacGrogan, D., Ho, L., Suh, J., Humala, N., Thiagarajan, M., Wang, J. and Pasinetti, G.M., 2006. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci*, 7, 29.
- Zuccato, C. and Cattaneo, E., 2009. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*, 5 (6), 311-22.

ARTICULOS EN LOS QUE HA PARTICIPADO DURANTE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

- Blazquez, C., Chiarlone, A., Sagredo, O., Aguado, T., Pazos, M.R., Resel, E., Palazuelos, J., Julien, B., Salazar, M., Borner, C., Benito, C., Carrasco, C., Diez-Zaera, M., Paoletti, P., Diaz-Hernandez, M., **Ruiz, C.**, Sendtner, M., Lucas, J.J., de Yebenes, J.G., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Romero, J., Alberch, J., Gines, S., Kraus, J., Fernandez-Ruiz, J., Galve-Roperh, I. and Guzman, M., 2011. *Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease*. Brain, 134 (Pt 1), 119-36.

- Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J.A., Tomas-Zapico, **C., Ruiz, C.**, Casarejos, M.J., Perucho, J., Gomez, A., Rodal, I., Lucas, J.J., Mena, M.A. and de Yebenes, J.G., 2009. *Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice*. Brain Res, 1281 91-100.

- **Ruiz, C.**, Casarejos, M.J., Rubio, I., Gines, S., Puigdellivol, M., Alberch, J., Mena, M.A. and de Yebenes, J.G., 2012. *The dopaminergic stabilizer, (-)-OSU6162, rescues striatal neurons with normal and expanded polyglutamine chains in huntingtin protein from exposure to free radicals and mitochondrial toxins*. Brain Res. 2012 Jun 12; 1459:100-12. Epub 2012 Apr 21.

- **Ruiz C.**, Casarejos MJ, Gomez A, Solano R, de Yebenes JG, Mena MA *Protection by glia-conditioned medium in a cell model of Huntington disease..* PLoS Curr. 2012 Jul 2; 4:e4fbca54a2028b

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice

Isabel Rubio^{a,b}, José Antonio Rodríguez-Navarro^c, Cristina Tomás-Zapico^{b,d},
 Carolina Ruíz^a, María José Casarejos^c, Juan Perucho^{b,c}, Ana Gómez^c, Izaskun Rodal^a,
 José J. Lucas^{b,d}, María Angeles Mena^c, Justo García de Yébenes^{a,b,*}

^aServicio de Neurología, Hospital Ramón y Cajal, Ctra Colmenar, Km 9.1, Madrid 28034, Spain^bCIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^cLaboratorio de Neurofarmacología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain^dCentro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC/UAM y CIBERNED, Madrid 28049, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 8 May 2009

Available online 21 May 2009

Keywords:

Apoptosis

Autophagy

Dopamine neurons

Huntington's disease

Park-2 gene

Ubiquitin proteasomal system

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by an expansion of polyglutamines which makes huntingtin more resistant to degradation. Parkin is an ubiquitin ligase which promotes proteasomal degradation of abnormal proteins. We investigated whether partial suppression of parkin increases HD phenotype. We studied the behavior and brain histology and biochemistry of the mice produced by interbreeding of R6/1 (model of HD in mice) with *Park-2*^{-/-} (parkin null mice): R6/1, WT (wild-type), *PK*^{-/-} (hemizygotic deletion of Park-2) and R6/1/*PK*^{-/-}. R6/1 and R6/1/*PK*^{-/-} mice had abnormal motor and exploratory behavior. R6/1/*PK*^{-/-} mice were more akinetic. These two groups of mice had severe but similar loss of nigrostriatal dopamine neurons and monoamine levels in striatum. R6/1/*PK*^{-/-} mice had fewer huntingtin inclusions and a greater number of TUNEL⁺ cells than R6/1 in striatum but there were no differences in the hippocampus. DARPP-32 protein was equally reduced in striatum of R6/1 and R6/1/*PK*^{-/-} mice. Striatal levels of GSH were increased, of HSP-70 reduced and of CHIP unchanged in both R6/1 and R6/1/*PK*^{-/-} mice. LC-3 II/I ratios were significantly increased in striatum of R6/1/*PK*^{-/-} mice. Partial suppression of parkin slightly aggravates the phenotype in R6/1 mice, confirming a pathogenic role of the UPS in the processing of mutant huntingtin. The absence of massive additional cellular lesions in R6/1/*PK*^{-/-} mice suggests the existence of compensatory mechanisms, such as autophagy, for the processing of huntingtin.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Servicio de Neurología, Hospital Ramón y Cajal, Ctra Colmenar, Km 9.1, Madrid 28034, Spain. Fax: +34 91 3369016.
 E-mail address: jgyebenes@yahoo.com (J.G. de Yébenes).

Abbreviations: TUNEL, TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling; DARPP-32, dopamine and c-AMP-regulated phosphoprotein; GSH, glutathione; HSP-70, heat shock protein-70; CHIP, c-terminal Hsc interacting protein; LC-3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; UPS, ubiquitin proteasomal system

0006-8993/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2009.05.039

Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease

Cristina Blázquez,^{1,2} Anna Chiarlone,^{1,2} Onintza Sagredo,^{1,3} Tania Aguado,^{1,2} M. Ruth Pazos,^{1,3} Eva Resel,^{1,2} Javier Palazuelos,^{1,2} Boris Julien,^{1,2} María Salazar,^{1,2} Christine Börner,⁴ Cristina Benito,^{1,5} Carolina Carrasco,^{1,2} María Díez-Zaera,^{1,6} Paola Paoletti,^{1,7} Miguel Díaz-Hernández,^{1,8} Carolina Ruiz,^{1,9} Michael Sendtner,¹⁰ José J. Lucas,^{1,8} Justo G. de Yébenes,^{1,9} Giovanni Marsicano,¹¹ Krisztina Monory,¹² Beat Lutz,¹² Julián Romero,^{1,5} Jordi Alberch,^{1,7} Silvia Ginés,^{1,7} Jürgen Kraus,⁴ Javier Fernández-Ruiz,^{1,3} Ismael Galve-Roperh^{1,2} and Manuel Guzmán^{1,2}

1 Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Huntington's Disease and Ataxias Collaborative Project, 28040 Madrid, Spain

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

3 Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

4 Department of Pharmacology and Toxicology, University of Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany

5 Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Research Unit, 28922 Madrid, Spain

6 Department of Biochemistry and Molecular Biology IV, School of Veterinary, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

7 Cell Biology and Pathological Anatomy Department, School of Medicine, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona University, 08036 Barcelona, Spain

8 Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

9 Department of Neurobiology, Ramón y Cajal Hospital, 28034 Madrid, Spain

10 Institute of Clinical Neurobiology, University of Würzburg, 97078 Würzburg, Germany

11 U862 INSERM, Bordeaux University 2, 33077 Bordeaux, France

12 Department of Physiological Chemistry, Johannes Gutenberg University Mainz, 55099 Mainz, Germany

Correspondence to: Manuel Guzmán,
 Department of Biochemistry and Molecular Biology I,
 School of Biology,
 Complutense University,
 C/ José Antonio Novais 2,
 28040 Madrid, Spain
 E-mail: mgp@bbm1.ucm.es

Correspondence may also be addressed to: Ismael Galve-Roperh. E-mail: igr@quim.ucm.es

Endocannabinoids act as neuromodulatory and neuroprotective cues by engaging type 1 cannabinoid receptors. These receptors are highly abundant in the basal ganglia and play a pivotal role in the control of motor behaviour. An early downregulation of type 1 cannabinoid receptors has been documented in the basal ganglia of patients with Huntington's disease and animal models. However, the pathophysiological impact of this loss of receptors in Huntington's disease is as yet unknown. Here, we generated a double-mutant mouse model that expresses human mutant huntingtin exon 1 in a type 1 cannabinoid receptor-null background, and found that receptor deletion aggravates the symptoms, neuropathology and molecular pathology of the disease. Moreover, pharmacological administration of the cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol to mice expressing human mutant huntingtin exon 1 exerted a therapeutic effect and ameliorated those parameters. Experiments conducted in striatal

Received April 8, 2010. Revised June 11, 2010. Accepted August 2, 2010.

© The Author (2010). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
 For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org



Research Report

The dopaminergic stabilizer, (–)-OSU6162, rescues striatal neurons with normal and expanded polyglutamine chains in huntingtin protein from exposure to free radicals and mitochondrial toxins

C. Ruiz^{a,b}, M.J. Casarejos^{b,c}, I. Rubio^{a,b}, S. Gines^{b,d}, M. Puigdelivol^{b,d}, J. Alberch^{b,d},
M.A. Mena^{b,c}, J.G. de Yébenes^{a,b,*}

^aDepartment of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^bCIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^cDepartment of Neurobiology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

^dDepartment of Biochemistry, University of Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 April 2012

Keywords:

Huntington's disease
Dopaminergic stabilizers
Neuroprotection
(–)-OSU6162
Pridopidine

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive motor, cognitive and psychiatric deficits, associated with predominant loss of striatal neurons and caused by a polyglutamine expansion in the huntingtin protein. There is so far neither cure nor approved disease-slowing therapy for HD, though recent clinical studies have shown a beneficial long-term effect of pridopidine in patients with HD. The nature of this effect, purely symptomatic or, in addition, neuroprotective, is difficult to elucidate in clinical trials. Pridopidine and (–)-OSU6162 are members of a new family of compounds referred to as dopaminergic stabilizers, which normalize abnormal dopamine neurotransmission.

We investigated the effects of (–)-OSU6162 on huntingtin knocked-in striatal neurons in culture. Control neurons had normal full-length huntingtin with 7 glutamines while “mutant” neurons had large expansions (Q=111). We studied the dose–effect curves of (–)-OSU6162 on mitochondrial activity, LDH levels, necrosis and apoptosis in untreated Q7 and Q111 cells. In addition, we investigated the effects of (–)-OSU6162 on Q7 and Q111 neurons challenged with different neurotoxins such as sodium glutamate, H₂O₂, rotenone and 3-nitropropionic acid (3NP). As we found prevention of toxicity of some of these neurotoxins, we investigated the putative neuroprotective mechanisms of action of (–)-OSU6162 measuring the effects of this dopaminergic stabilizer on expression and release of BDNF, the ratios of Bcl2/Bax proteins and of p-ERK/ERK, the levels of chaperones and GSH, and the effects of (–)-OSU6162 on dopamine uptake and release.

* Corresponding author at: Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Crta. de Colmenar km 9,1. Madrid 28034, Spain.

E-mail address: jgyeben@yaho.com (J.G. de Yébenes).

Abbreviations: BDNF, brain derived neurotrophic factor; CHIP, carboxy terminus of Hsp70-binding protein; DIV, days in vitro; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, fetal bovine serum; GSH, glutathione; HD, Huntington's disease; HSP70, heat-shock protein 70 kDa; H₂O₂, hydrogen peroxide; LDH, lactate dehydrogenase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; 3NP, 3-nitropropionic acid; p-ERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase; Q7, STHdH^{Q7/Q7} cells; Q111, STHdH^{Q111/Q111} mutant cells

0006-8993/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2012.04.021

Please cite this article as: Ruiz, C., et al., The dopaminergic stabilizer, (–)-OSU6162, rescues striatal neurons with normal and expanded polyglutamine chains in huntingtin pro..., Brain Res. (2012), doi:10.1016/j.brainres.2012.04.021

Protection by glia-conditioned medium in a cell model of Huntington disease

[Carolina Ruiz](#), [Maria Jose Casarejos](#), [Ana Gomez](#), [Rosa Solano](#), [Justo Garcia de Yebeles](#), and [Maria Angeles Mena](#)

[Copyright and License information ►](#)

[Go to:](#)

Abstract

The physiological role of huntingtin and the pathogenic mechanisms that produce the disease are unknown. Mutant huntingtin changes its normal localization and produces cytoplasmic and intranuclear inclusions, changes gene transcription, alters synaptic transmission, impairs mitochondrial activity and activates caspases and other pro-apoptotic molecules, promotes excitotoxicity, energy deficits, synthesis and release reduction of neurotrophic factors and oxidative stress. Previous studies confirm that the mutant huntingtin difficult neurotrophic function of astrocytes leading to neuronal dysfunction in Huntington's disease. Our objective was to study the neuroprotective potential role of glia-conditioned medium (GCM) in an in vitro model of Huntington's disease. We used conditionally-immortalized striatal neuronal progenitor cell lines (STHdhQ7/Q7 and STHdhQ111/Q111) expressing endogenous levels of normal and mutant huntingtin with 7 and 111 glutamines, respectively. We studied the protection of fetal and postnatal glia conditioned medium (GCM) on H₂O₂ (2 μ M), glutamate (5 mM) and 3-nitropropionic acid (2.5 mM) related toxicity. We also compared the neuroprotective effects of GCM versus that of the growth factors bFGF, BDNF and GDNF. Fetal GCM protects from every toxin, reducing the cell death and increasing the cell survival. Fetal GCM reduces the caspases fragmentation of the protein PARP, the expression of chaperone Hsp70 and the accumulation of ROS and polyubiquitinated proteins. In addition, in Q111 striatal cells treated with H₂O₂ (2 μ M) for 24 hours, the intracellular GSH levels are higher in the presence of GCM. Notably, the 13-day and 2-month postnatal GCM, totally protects from H₂O₂ induced cell death in mutant striatal cells. GCM neuroprotective effects are more potent than those of the already identified neurotrophic factors. We conclude that GCM protects Q111 cells from neuronal neurotoxins and the effects of GCM are more potent than those of any known neurotrophic factor. GCM may contain new and more potent, as yet unidentified, neurotrophic molecules, potentially useful in patients with Huntington's disease.

CONGRESOS Y SEMINARIOS

- Reunión anual del **CIBERNED** (Grupo Enfermedad de Huntington) 23-24 mayo 2008 (El Paular, Madrid).
- **5th Plenary Meeting of EHDN. Póster:** Título: *Effects of parkin deficiency on mutant huntingtin in mice.* (Lisboa 2008).
- Reunión anual del **CIBERNED** (Grupo Enfermedad de Huntington) 29-30 mayo 2009 (Navacerrada, Madrid). Ponencia: *The effects of olive oil in R6/1 transgenic mice.*
- **EHDN 6th Plenary Meeting Prague.** Praga, 3-5 Septiembre 2010.
- **SENC 2011. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia. Poster:** (-) – *OSU6162, estabilizador dopaminérgico, rescata neuronas estriatales mutantes para huntingtina del daño producido por estrés oxidativo y daño mitocondrial.* C. Ruiz ¹, M.J. Casarejos ², A. Gomez ², S. Gines ³, M. Puigdemívol ³, J. Alberch ³, M.A. Mena ², J.G. de Yébenes ¹. Departamento de Neurología ¹ y Neurobiología ², Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid (IRYCIS). Departamento de Bioquímica, Universidad de Barcelona ³ y CIBERNED ^{1,2,3}.
- **EHDN 7th Plenary Meeting Stockholm. Poster:** *A double blind, cross over, placebo-controlled, phase II trial of Sativex in Huntington's Disease.*
JG Caldentey*, JLL Sendon*, P Trigo*, C Ruiz*, GG Ribas*, M Aguilar*, MA Galvez*, I Pablo*, I Galve-Roth#, O Sagredo#, JJ Fernandez-Ruiz#, M Guzman#, JG de Yébenes*.
* Hospital Ramón y Cajal, # Universidad Complutense, Madrid, Spain.
- **6º Foro CIBERNED. Madrid 24-25 Octubre 2012. Poster:** *Effects of olive oil in the mouse model of Huntington's disease, R6/1.* Ruiz C ^{1,3}, Rubio I ^{1,3}, Casarejos MJ ^{2,3}, Rodal I ^{1,3}, Mena MA ^{2,3}, Yébenes JG ^{1,3} Departament of Neurology ¹ and Neurobiology ². Hospital Ramón y Cajal, Madrid, and CIBERNED³ Spain.